

**Identifizierung,
Klonierung und Charakterisierung
von replikationsdefekten SV40 Genomen
aus SV40 transformierten Nagetierzellen**

Bernd Huber

München 1986





Digitized by the Internet Archive
in 2026

**IDENTIFIZIERUNG, Klonierung und Charakterisierung
von Replikationsdefekten SV40 Genomen
aus SV40 transformierten Nagetierzellen**

**Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität, München**

vorgelegt

von

Bernd Huber

am

30. September 1986

Tag der mündlichen Prüfung: 27.11.86

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Fanning-Honegger
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. L. Winnacker

Die vorliegende Arbeit ist ein Teil der von mir im Jahre 1900
auf Veranlassung des Herrn Dr. med. Dr. phil. Dr. jur. Dr. phil.
in Jena, Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil.
Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil.
Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil.

Die vorliegende Arbeit ist ein Teil der von mir im Jahre 1900
auf Veranlassung des Herrn Dr. med. Dr. phil. Dr. jur. Dr. phil.
in Jena, Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil.
Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil.
Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil.

Die vorliegende Arbeit ist ein Teil der von mir im Jahre 1900
auf Veranlassung des Herrn Dr. med. Dr. phil. Dr. jur. Dr. phil.
in Jena, Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil.
Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil.

Die vorliegende Arbeit ist ein Teil der von mir im Jahre 1900
auf Veranlassung des Herrn Dr. med. Dr. phil. Dr. jur. Dr. phil.
in Jena, Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil.
Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil.

Die vorliegende Arbeit ist ein Teil der von mir im Jahre 1900
auf Veranlassung des Herrn Dr. med. Dr. phil. Dr. jur. Dr. phil.
in Jena, Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil.

F U R M E I N E F R A U

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 1983 bis September 1986 auf Anregung und unter Leitung von Frau Prof. Dr. E. Fanning am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Frau Prof. Dr. E. Fanning danke ich sehr herzlich für das Interesse und die Unterstützung, die sie dieser Arbeit und mir persönlich jederzeit zuteil werden ließ.

Ebenso danke ich Ihr für die vielen Anregungen und hilfreichen Diskussionen im Verlauf der letzten Jahre, sowie für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Außerdem gilt mein Dank allen Mitgliedern des Arbeitskreises für die freundschaftliche Atmosphäre und die hilfreichen Diskussionen.

Besonders danke ich unseren tech. Assistentinnen Gabi Hartmann, Ursula Markau und Silke Dehde für ihre tatkräftige Hilfe und Andrea Schmid für die Anfertigung der Photographien.

Einen ganz besonderen Dank schulde ich Sabine Domrath für ihre unermüdliche Arbeit am Computer.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Das große Tumorantigen (T-Antigen)	3
1.2	Interaktionen zwischen T-Antigen und DNA	4
1.3	Die Rolle des T-Antigens bei der Regulation der frühen Genexpression und bei der Initiation der DNA-Replikation	7
1.4	Die Rolle des T-Antigens bei der Transformation	9
1.5	Aufgabenstellung	11
2.	MATERIAL	12
2.1	Zelllinien	12
2.2	Medien	12
2.3	Bakterienstämme	13
2.4	Medien	13
2.5	Plasmide	14
2.6	Antikörper	16
2.7	Enzyme	16
2.8	Chemikalien und andere Materialien	16
2.9	Puffer und Lösungen	18
3.	METHODEN	25
3.1	Zellkultivierung	25
3.2	Zellfusion	25
3.3	DNA-Transfektion von tierischen Zellen	25
3.3.1	DEAE-Dextran Methode	26
3.3.2	Kalziumphosphat-Kopräzipitationsmethode	26
3.4	Transformation von Rattenzellen (Rat2)	27
3.5	Isolierung chromosomaler DNA aus tierischen Zellen	27
3.6	Isolierung niedermolekularer DNA aus tierischen Zellen	29
3.7	Enzymatische Reaktionen mit DNA	29
3.7.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	29

3.7.2	Abspaltung von 5'-Phosphaten durch alkalische Phosphatase	30
3.7.3	Phosphorylierung von 5'-Hydroxylgruppen mit Polynukleotidkinase	31
3.7.4	Verknüpfung von DNA-Fragmenten durch Ligase-Reaktion	31
3.8	Charakterisierung von DNA	31
3.8.1	Auftrennung von DNA in Agarosegelen	31
3.8.2	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	32
3.8.3	Transfer von DNA aus Agarosegelen auf Nitrozellulose	33
3.8.4	Nick-Translation	33
3.8.5	Hybridisierung	35
3.8.6	DNA-Sequenzierung	36
3.9	Klonierung und Identifizierung von rekombinanten Plasmiden	37
3.9.1	Herstellung von transformations- kompetenten Bakterien	37
3.9.2	Transformation von Bakterien	38
3.9.3	Schnellpräparation von Plasmid-DNA	38
3.9.4	Isolierung von Plasmid-DNA über Dichtegradientenzentrifugation	39
3.9.5	Kolonie-Hybridisierung	40
3.10	Identifizierung und Charakterisierung von T-Antigenen	41
3.10.1	Immunperoxidase Färbung	41
3.10.2	Laemmli-SDS-Polyacrylamid-Gel- elektrophorese	41
3.10.3	Transfer von Proteinen aus Polyacryl- amidgelen auf Nitrozellulose	43
3.10.4	Färbung von Proteinen, gebunden an Nitrozellulose, durch das Biotin- Streptavidin-System	43
3.10.5	DNA Bindung	44
3.10.5.1	Präparation des Zellextrakts	44

3.10.5.2	Präparation der Staphylococcus- aureus Bakterien	44
3.10.5.3	DNA Bindung	44
3.10.6	ATPase-Reaktion	45
4.	ERGEBNISSE	47
4.1	Identifizierung von replikationsdefekten SV40 Genomen in transformierten Zellen	47
4.2	Analysierung von viralen DNA-Sequenzen in SV40 transformierten Zellen	52
4.3	Isolierung und Klonierung von replikations- defekten SV40 Genomen aus transformierten Zellen	57
4.4	Restriktionsanalyse der klonierten SV40 Genome	59
4.5	Expression der T-Antigene von klonierten SV40 Genomen	77
4.6	Transformation von Rattenfibro- blastenzellen	77
4.7	Nachweis und Größenbestimmung der T-Antigene in den transformierten Rat2 Zellen	80
4.8	Zellfusion zwischen den transformierten Linien Rat SV VLM 4, 8 bzw. Rat SV H65 12, 17, 34 und COS-1 bzw. TC7 Zellen	85
4.9	Untersuchungen zur DNA-Bindung der T-Antigene aus den transformierten Rat2 Zellen	87
4.10	Untersuchungen zur ATPase-Aktivität der T-Antigene aus den transformierten Rat2 Zellen	91
4.11	DNA-Replikation der klonierten SV40 Genome	93
4.12	DNA-Replikation der subklonierten "origin"-Bereiche aus den Klonen pSV VLM 4, 8	95



4.13	Untersuchungen zur DNA-Replikation von SV40 Genomen, in denen das BamHI/BstXI-Fragment der frühe Region jeweils durch das entsprechende Fragment der Klonen pSV VLM 4, 8 bzw. pSV H65 12 ersetzt wurde	99
4.14	Untersuchungen zur DNA-Replikation der Klonen pSV VLM 4, 8 bzw. pSV H65 12, 17, 34 nach Rotransfektion mit klonierten SV40 "origin"-Fragmenten	103
5.	DISKUSSION	113
6.	ZUSAMMENFASSUNG	125
7.	LITERATURVERZEICHNIS	127
8.	VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN	145

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abb. 1:	Schematische Darstellung des SV40-Genom (aus O'Brain, 1984; nach Fiers et al., 1978)	2
Abb. 2:	Funktionskarte des SV40 T-Antigens	5
Abb. 3:	Kontrollbereiche in der "origin"-Region von SV40	6
Abb. 4:	Schematische Darstellung der Apparatur für den Transfer von DNA aus Agarosegelen auf Nitrozellulosefilter	34
Abb. 5:	Zellfusionen zwischen SV40 transformierten Zelllinien VLM, MKSA, THK-lt, C0631, C0625 und TC7- bzw. COS-1 Zellen	49
Abb. 6:	Zellfusionen zwischen der SV40 transformierten Zelllinie ELONA und TC7- bzw. COS-1 Zellen	50
Abb. 7:	Darstellung der SV40 DNA in den transformierten Linien ELONA und THK-lt nach Fusion mit TC7 Zellen	53
Abb. 8:	Analysierung der viralen DNA-Sequenzen in den transformierten Linien VLM und MKSA	55
Abb. 9:	Analysierung der viralen DNA-Sequenzen in den transformierten Linien THK-lt und H65/90B	56
Abb. 10:	Restriktionsanalyse der Klone pSV VLM 4, 8 und pSV H65 12, 17, 34 (1)	60
Abb. 11:	Restriktionsanalyse der Klone pSV VLM 4, 8 und pSV H65 12, 17, 34 (2)	63

Abb. 12: Nachweis des EcoRI-Fragments (1.0 kb) aus dem Klon pSV VLM 8 als nicht virales DNA-Fragment	65
Abb. 13: Nachweis des EcoRI-Fragments (1.0 kb) in der Zell DNA der transformierten Zelllinie VLM	66
Abb. 14: Restriktionsanalyse der Klone pSV VLM 4, 8 und pSV H65 12, 17, 34 (3)	67
Abb. 15: Restriktionsanalyse der Klone pSV VLM 4, 8 und pSV H65 12, 17, 34 (4)	69
Abb. 16: DNA-Sequenzen des subklonierten "origin"- Fragments HindIII/SphI aus den Klonen pH-S wt, pH-S VLM 4, 8 bzw. pH-S H65 34	71
Abb. 17: DNA-Sequenzen des subklonierten "origin"- Fragments SphI/EcoRI aus dem Klon pS-R VLM 4	73
Abb. 18: Restriktionskarten der Klone pSV VLM 4, 8 und pSV H65 12, 17, 34	75
Abb. 19: Expression der T-Antigene von den Klonen pSV VLM 4, 8 und pSV H65 12, 17, 34 in TC7 Zellen	78
Abb. 20: Expression des wt T-Antigens in TC7 Zellen	79
Abb. 21: Darstellung eines Focus von Rat2 Zellen, die durch den Klon pSV VLM 4 transformiert wurden	81
Abb. 22: Darstellung von nicht transformierten Rat2 Zellen	82
Abb. 23: Expression der T-Antigene in den transformierten Rat2 Zellen	84

Abb. 24: Größenbestimmung aus den trans-	
formierten Rat2 Zellen	86
Abb. 25: Zellfusionen zwischen den transformierten	
Rat2 Zelllinien und COS-1 bzw. TC7 Zellen	88
Abb. 26: DNA-Bindung der T-Antigene aus den trans-	
formierten Linien Rat SV VLM 4, 8	90
Abb. 27: DNA-Bindung der T-Antigene aus den trans-	
formierten Linien Rat SV H65 12, 17, 34	92
Abb. 28: DNA-Replikation der klonierten SV40 Genome	96
Abb. 29: DNA-Replikation der subklonierten "origin"-	
Bereiche aus den Klonen pSV VLM 4, 8	98
Abb. 30: Vergleich der DNA-Replikation von sub-	
klonierten "origin"-Fragmenten zu zwei	
verschiedenen Zeitpunkten nach	
Transfektionen	100
Abb. 31: DNA-Replikation von SV40 Genomen, in	
denen das BamHI/BatXI-Fragment der	
frühen Region jeweils durch das	
entsprechende Fragment der Klone pSV VLM	
4, 8 bzw. pSV H65 12 ersetzt wurde	102
Abb. 32: DNA-Replikation der Klone pSV VLM 4, 8	
bzw. pSV H65 12, 17, 34 nach Kotrans-	
fektion mit pKP DNA (kloniertes SV40 wt	
"origin"-Fragment)	104
Abb. 33: DNA-Replikation der Klone pSV VLM 4, 8	
nach Kotransfektion mit den subklonierten	
HindIII/SphI "origin"-Fragmenten	
(pH-S wt bzw. pH-S VLM)	107

Abb. 34: DNA-Replikation des Klon ^s pSV H65 34 nach K ^o transfektion mit den subklonierten HindIII/SphI "origin"-Fragmenten (pH-S wt, pH-S H65 34)	108
Abb. 35: DNA-Replikation der Klone pSV VLM 4, 8 nach K ^o transfektion mit dem Hybrid-Klon pH-N (VLM)-N-S (wt)	110
Abb. 36: Vergleich der DNA-Bindung des T-Antigens aus der Zelllinie Rat SV VLM 4 an den HindIII/SphI Fragmenten der Klone pH-S wt bzw. pH-S VLM	112

VERZEICHNIS DER TABELLEN

Tab. 1: Vergleich der Transformationshäufigkeit von T-Antigenen der Klone pSV VLM 4, 8 und pSV H65 12, 17, 34	83
Tab. 2: ATPase-Aktivität der T-Antigene aus den transformierten Rat2 Zellen ^a	94
Tab. 3: Zusammenfassung der biologischen und biochemischen Eigenschaften der Klone pSV VLM 4, 8 und pSV H65 12, 17, 34	124

1. EINLEITUNG

Das Simian Virus (SV40) ist ein DNA-Tumervirus, das von Sweet und Hillman 1960 erstmals beschrieben wurde. Das Virus gehört in die Gruppe der Papovaviren, zu denen ferner das mit SV40 stark verwandte Polyoma Virus, die Familie der Papilloma Viren und die menschlichen JC- und BK-Typ Viren zurechnen sind.

Der natürliche Wirt des SV40 ist die Grüne Meerkatze, deren Nierenzellen permissiv sind und dem Virus erlauben, sich vollständig zu replizieren und sich durch lytische Infektion zu vermehren. Die für SV40 nicht-permissiven Mauszellen, in denen sich das Virus nicht vollständig replizieren kann, und die für SV40 semi-permissiven Menschen- und Hamsterzellkulturen, die nur in einigen wenigen Zellen eine Replikation des Virus erlauben, können durch SV40 stabil transformiert werden (Tooze, 1981).

Das Genom von SV40 ist eine doppelsträngige DNA mit 5243 Nukleotidpaaren (Reddy et al., 1978; Fiers et al., 1978). Die DNA ist superhelical angeordnet und mit Wirtszellhistonen assoziiert (Tooze, 1981).

Die physikalische Karte (Abb. 1) zeigt die Organisation des Virus Genoms, das bei 0.67 Karteneinheiten in Bezug auf die EcoRI-Schnittstelle den Startpunkt für die Replikation (origin of replication) aufweist und eine zeitliche Einteilung der Genexpression in eine frühe und eine späte Region erkennen läßt. Die frühe Region wird vor Beginn der viralen DNA-Replikation transkribiert, wobei sie von 0.67-0.17 Kartierungseinheiten entgegen dem Uhrzeigersinn abgelesen wird.

Sie kodiert für das große Tumorantigen (T-Antigen) und für das kleine Tumorantigen (t-Antigen). Die späte Region wird dagegen transkribiert, während oder nachdem die virale DNA-Replikation begonnen hat. Sie wird von 0.67-0.17 Kartierungseinheiten im Uhrzeigersinn abgelesen und kodiert für die 3 Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3 und für das erst

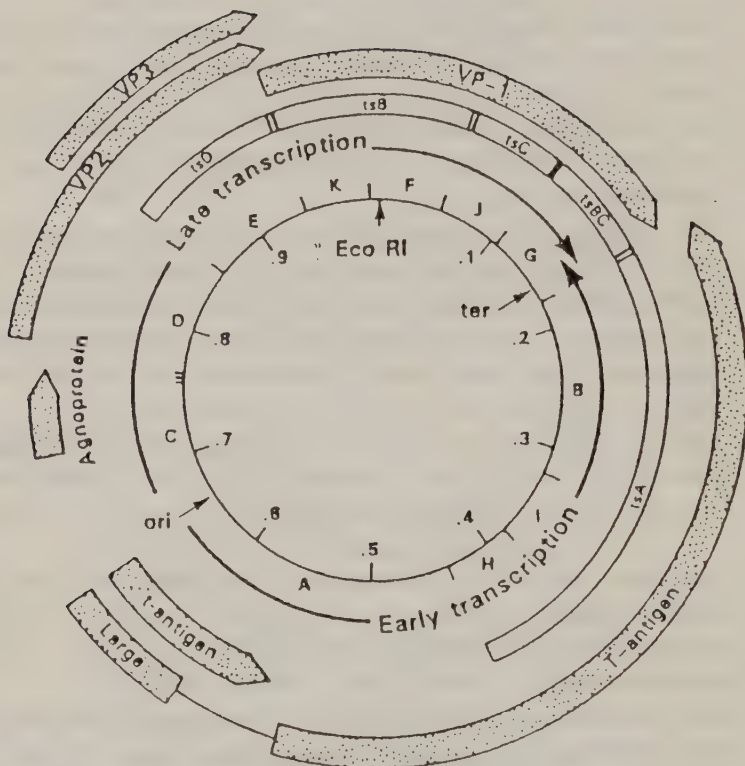


Abb. 1: Schematische Darstellung des SV40-Genoms
(aus O'Brain, 1984; nach Fiers et al., 1976)

Das SV40-Genom ist hier mit Angabe der Kartierungseinheiten, ausgehend von der einzigen EcoRI-Schnittstelle, gezeigt. Dargestellt sind die für die Virusproteine kodierenden Bereiche, die Bereiche der frühen und späten Transkription, sowie die für die temperatursensitiven Phänotypen wichtigen Genabschnitte (tsA, B, C, D). Ferner sind die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme HindII und HindIII aufgezeigt.

bei der Virusreifung nachweisbare Agnoprotein (Jay et al., 1981).

1.1 Das große Tumorantigen (T-Antigen)

Das große SV40 T-Antigen ist ein Phosphoprotein von etwa 87 kD. Es ist ein multifunktionales Regulationsprotein, das viele unterschiedliche biologische Funktionen in den durch SV40 infizierten und transformierten Zellen ausübt. So kann es die virale DNA-Replikation initiieren und seine eigene Expression, sowie die Transkription der späten Gene regulieren. Weiterhin induziert es die zelluläre DNA-Replikation und stimuliert die Synthese zellulärer Proteine. Schließlich ist das T-Antigen notwendig für die Ausbildung und die Erhaltung der zellulären Transformation durch SV40 (Tooze, 1981; Rigby and Lane, 1983).

Das T-Antigen ist hauptsächlich im Zellkern lokalisiert, wo ein Teil mit Chromatin und Kernmatrix assoziiert ist (Staufenbiel and Deppert, 1983; Covey et al., 1984). Geringe Mengen des Proteins werden aber auch in der Plasmamembran gefunden (Soule and Butel, 1979; Deppert et al., 1980).

Dem T-Antigen werden ferner eine Reihe von biochemischen Aktivitäten zugeschrieben. So liegt es in verschiedenen aggregierten Formen vor, wobei das Monomer als Vorläufer für die tetramere Form des Proteins dient (Fanning et al., 1981; Fanning et al., 1984). Der Aggregationsprozeß wird wahrscheinlich durch den Phosphorylierungsgrad des T-Antigens gesteuert (Baumann and Hand, 1982). Ferner kann das T-Antigen an virale und zelluläre DNA binden. In transformierten und auch in lytisch infizierten Zellen findet man das T-Antigen in einem Komplex mit dem zellulären Phosphoprotein P53. Weiterhin kann das T-Antigen Nukleotide binden und ATP bzw. dATP spalten (Tooze, 1981; Rigby and Lane, 1983). Die ATPase-Aktivität ist dabei korreliert mit der Fähigkeit des T-Antigens als Helikase zu wirken (Stahl et al., 1986).

In genetischen und biochemischen Studien konnte nun gezeigt werden, daß einige dieser Aktivitäten verschiedenen Domänen des T-Antigens zugeordnet werden können (Abb. 2). So schreibt man die virale DNA-Bindung dem N-terminalen Bereich des T-Antigens zwischen den Aminosäuren 130-272 zu (Prives et al., 1982; Clark et al., 1983; Paucha et al., 1986; Simmons, 1986), während die ATPase-Aktivität im Bereich der Aminosäuren 265-660 gesehen wird (Clark et al., 1983; Cole et al., 1986). Es gibt aber auch gute Hinweise dafür, daß die einzelnen Domänen des T-Antigens nicht völlig unabhängig voneinander arbeiten können. So wurde deutlich, daß durch ATP die spezifische Bindung des T-Antigens an den SV40 "origin" allosterisch gehemmt wird (Vogt et al., 1986; Fanning and Vogt, 1986 im Druck; Arthur and Fanning, in Vorbereitung).

1.2 Interaktionen zwischen T-Antigen und DNA

Es ist schon seit längerem bekannt, daß das T-Antigen an doppelsträngige DNA und bevorzugt an den Replikationsursprung des SV40 (origin of replication) bindet (Reed et al., 1975; Tjian, 1978). In den letzten Jahren haben mehrere Arbeitsgruppen versucht zu klären, welche Nukleotide in der Region um den Replikationsursprung an der DNA-T-Antigen Interaktion beteiligt sind (Abb. 3). Die Untersuchungen wurden zumeist mit dem SV80 T-Antigen bzw. dem Adeno-SV40 Hybridprotein D2-T durchgeführt, dessen C-Terminus 90% des SV40 T-Antigens enthält und das am N-Terminus Adeno-Sequenzen trägt (Hassell et al., 1978). Beide Proteine sind defekt für die Initiation der viralen DNA-Replikation. In Arbeiten von Tjian wurde gezeigt, daß im Bereich des Replikationsursprungs zwei sequenzspezifische Bindungsstellen I und II vorhanden sind, die auch in dieser Reihenfolge vom D2-T Protein bevorzugt werden (Tjian, 1978).

Die Bindungsstelle I liegt dabei auf der frühen Seite des Replikationsursprungs, während die Bindungsstelle II mit dem

Domain Structure of SV40 T Antigen

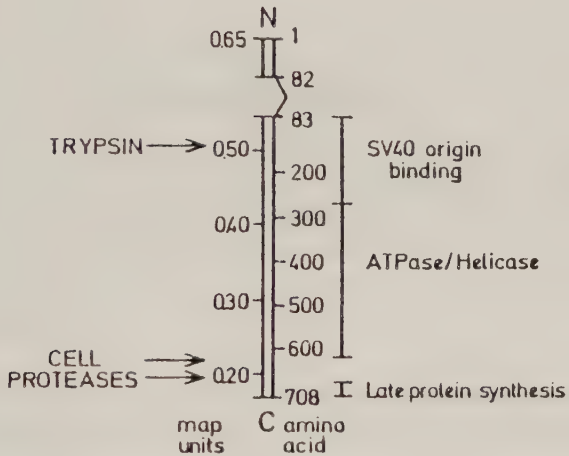


Abb. 2: Funktionskarte des SV40 T-Antigens

Die Zahlen in der linken Hälfte geben die Kartierungseinheiten der DNA in Bezug auf die EcoRI-Schnittstelle des viralen Genoms wieder, während die Zahlen in der rechten Hälfte den Aminosäure-Nummern im Protein entsprechen.

genetisch definierten "minimal-origin" überlappt. Diese Bindungsstellen konnten ferner in Arbeiten von Shalloway et al., (1980) mit dem gereinigten T-Antigen aus SV80 Zellen und durch Tegtmeyer et al., (1981) mit dem wt T-Antigen bestätigt werden.

In weiteren Studien mit diesen Proteinen wurde nun gezeigt, daß für das T-Antigen eine Erkennungssequenz in diesen Bindungsstellen existiert (Tjian, 1978; Tegtmeyer et al., 1981; De Lucia et al., 1983; Mastrangelo et al., 1985; Ryder et al., 1985). Es handelt sich um ein Pentanukleotid mit der Consensus-Sequenz 5'-GAAGC-3', das mehrmals pro Bindungsstelle und insgesamt sieben mal im Bereich des Replikationsursprungs vorkommt (Tegtmeyer et al., 1983; Mastrangelo et al., 1985). Die Anordnung dieser Pentanukleotide in den einzelnen Bindungsstellen ist unterschiedlich und könnte somit auf die verschiedenen Affinitäten des T-Antigens zu diesen DNA-Sequenzen hinweisen.

1.3 Die Rolle des T-Antigens bei der Regulation der frühen Genexpression und bei der Initiation der DNA-Replikation

In den letzten Jahren haben mehrere Gruppen versucht, den Zusammenhang zwischen der in vitro gezeigten DNA-Bindung des T-Antigens und der in vivo Regulation der frühen Genexpression bzw. der Initiation der DNA-Replikation aufzuklären. In Untersuchungen von Mutanten der T-Antigen Bindungsstelle I konnte gezeigt werden, daß mit der Bindung des T-Antigens an diese Bindungsstelle die Autoregulation der frühen Genexpression gekoppelt ist. Der Startpunkt (EI) für die Transkription der frühen Gene liegt zu Beginn der Infektion nahe des DNA-Replikationsursprungs in der Bindungsstelle II. Später in der Infektion verschiebt sich der Transkriptionsstart (EII) um 40-60 bp in Richtung der SP1-Bindungsstellen. Es konnte nun gezeigt werden, daß durch die Bindung des T-Antigens an die Bindungsstelle I die Startstelle (EI) für die Transkription der frühen Gene

blockiert ist. Die Startstelle (EII) für die Transkription der frühen Gene wird dagegen erst blockiert, wenn die Bindungsstellen I und II durch T-Antigene besetzt sind (Rio et al., 1980; Hansen et al., 1981; Di Maio and Nathans, 1982).

In Untersuchungen von Mutanten der Bindungsstelle II konnte ferner nachgewiesen werden, daß diese Bindungsstelle durch das T-Antigen besetzt sein muß, damit die DNA-Replikation initiiert werden kann (Shortle et al., 1979; Di Maio and Nathans, 1980; Margolskee and Nathans, 1984). Die Bindungsstelle II liegt im Bereich des "minimal origin", der sich zwischen den Nukleotiden 5211 und 31 erstreckt. Es konnte gezeigt werden, daß dieser spezielle Bereich des "origin of replication" ausreichend ist, um unter der Kontrolle des T-Antigens eine DNA-Replikation zu initiieren (Subramanian and Shenk, 1978; Myers and Tjian, 1980; Di Maio and Nathans, 1982; Bergama et al., 1982; De Lucia et al., 1986; Deb et al., 1986). Der "minimal origin" besitzt neben der T-Antigen Bindungsstelle II zwei weitere funktionelle Domänen. Es handelt sich dabei um die TATA-Box und um ein 10 bp langes Fragment, das zwischen den Nukleotiden 5211 und 5220 liegt und dessen Sequenz hochkonserviert ist unter den Primaten Papovaviren. Basenaustausche in dieser Region führen zu einer drastischen Abnahme der Replikationseffizienz (Deb et al., 1986). Es konnte allerdings auch gezeigt werden, daß die in vivo Replikationseffizienz des "minimal origin" um das zwanzigfache erhöht wird, wenn seine flankierenden regulatorischen Elemente vorhanden sind. Es handelt sich dabei um die T-Antigen Bindungsstelle I, den Promoter- und Enhancer des SV40 (De Lucia et al., 1986). Die in vitro Replikationseffizienz des "minimal origin" wird dagegen nur durch die T-Antigen Bindungsstelle I gefördert, während die SP1-Bindungsstellen und der Enhancer nur wenig oder gar keinen Effekt haben (Li and Kelly, 1986; Stillman et al., 1985; Li et al., 1986). Das T-Antigen muß allerdings sowohl

für die in vivo wie auch für die in vitro Replikation des "minimal origin" an die Bindungsstelle II binden und eine ATPase (Helikase)-Aktivität besitzen (Manos and Gluzman, 1984, 1985; Stillman et al., 1985). Möglicherweise spielt aber auch die Hemmung der DNA-Bindung des T-Antigens durch ATP eine wichtige Rolle bei der Initiation oder Elongation der DNA-Replikation (Vogt et al., 1986; Fanning and Vogt, 1986 im Druck).

Für die Initiation der SV40 DNA-Replikation wird neben dem T-Antigen und dem "minimal origin" eine weitere Komponente, die permissive Zelle, benötigt. Die Eigenschaft "permissiv" drückt dabei aus, daß in einer Zelle vermutlich Faktoren exprimiert werden, die für die Initiation der SV40 DNA-Replikation unerläßlich sind. Diese Faktoren liegen höchst wahrscheinlich in Affen- und in Hela-Zellen vor, da hier eine SV40 DNA-Replikation möglich ist. Bisher gelang es allerdings nicht diese Faktoren zu identifizieren, obwohl es gute Hinweise gibt, daß ein DNA Polymerase α -Primase Komplex daran beteiligt sein könnte. In Arbeiten von Murakami konnte gezeigt werden, daß zur in vitro Replikation der SV40 DNA Extrakte aus Affen- oder Hela-Zellen nicht aber aus Mauszellen verwendet werden können. Es konnte allerdings nachgewiesen werden, daß Mauszellextrakte, in denen der Maus eigene DNA Polymerase α -Primase Komplex durch den entsprechenden gereinigten Komplex aus Affen- oder Hela-Zellen ersetzt wurde, eine in vitro Replikation der SV40 DNA ermöglichen (Murakami et al., 1986). Dies läßt einen Zusammenhang zwischen DNA Polymerase α -Primase Komplex und zellspezifischer Replikation der SV40 DNA vermuten.

1.4 Die Rolle des T-Antigens bei der Transformation

Zellen, die für SV40 nicht- bzw. semi-permissiv sind, können durch das Virus stabil transformiert werden. Dabei wird das virale Genom in die Zell-DNA integriert (Tooze, 1981). In Studien mit temperatursensitiven T-Antigen Mutanten (Osborn

and Weber, 1975; Tegtmeyer, 1975) und durch Mikroinjektionsexperimente (Antman and Livingston, 1980) konnte gezeigt werden, daß die ständige Expression des T-Antigens für die Initiation und die Erhaltung des transformierten Zellzustandes notwendig ist. Das T-Antigen verursacht weitreichende Änderungen in der Zelle, wobei durch Mikroinjektion des Proteins in eine Zelle gezeigt wurde, daß das T-Antigen die zelluläre DNA-Replikation initiieren und die Anzahl der Startstellen bei der DNA-Replikation erhöhen kann (Tjian et al., 1978; Martin and Oppenheim, 1977).

Ferner kann das T-Antigen zelluläre Enzyme induzieren und direkt die Transkription der rDNA beeinflussen (Rigby and Lane, 1983). Die Fähigkeit des T-Antigens nicht nur an den SV40 "origin of replication" sondern auch an zelluläre DNA Sequenzen zu binden, könnte hierbei eine wichtige Rolle spielen (Oren et al., 1980).

Das T-Antigen zeigt unterschiedliche biologische Funktionen in Zellen, die durch SV40 infiziert oder transformiert wurden. Genetische Studien lassen vermuten, daß bestimmte lytische Funktionen des T-Antigens getrennt von seinen Funktionen in der Zelltransformation vorliegen (Cosman and Tevethia, 1981; Pintel et al., 1981). Dies geht besonders aus Arbeiten hervor, die sich mit der Charakterisierung von T-Antigenen und Super T-Antigenen aus SV40 transformierten Zellen befassen (Clayton et al., 1982; Stringer, 1982; May et al., 1983). Diese Untersuchungen zeigen, daß die T-Antigene Mutationen bzw. Duplikationen aufweisen, die dazu führen, daß die Proteine zwar effektiv für die Transformation sind, aber keine virale DNA-Replikation mehr initiieren können. Es gibt sogar Hinweise dafür, daß in transformierten Zellen eine Selektion gegen replikationsaktive T-Antigene stattfindet (Small et al., 1982; Rigby and Lane, 1983). Ein Grund für diese Selektion könnte dabei die Fähigkeit eines replikationsaktiven

T-Antigens sein, Reorganisationen im zellulären Genom zu bewirken (Rigby and Lane, 1983).

1.5 Aufgabenstellung

SV40 transformierte Zellen exprimieren T-Antigene, die oftmals replikationsdefekt sind (Manos and Gluzman, 1984, 1985). Aus meiner Diplomarbeit gingen erste Hinweise auf Zelllinien hervor, die ebenfalls replikationsdefekte T-Antigene exprimieren. Unter diesen Linien stellten sich die transformierten Mauszelllinien VLM (Zarling and Tevethia, 1973) und MKSA (Dubbs et al., 1967; Kit et al., 1969) als besonders interessant heraus, da sie T-Antigene exprimieren, die die Bindungsstellen I und II des SV40 "origin" binden können, die eine ATPase-Aktivität aufweisen und auch ATP binden können, die aber dennoch replikationsdefekt sind (Huber et al., 1985). Diese T-Antigene lassen möglicherweise eine neue Eigenschaft erkennen, die wichtig ist für die DNA-Replikation. Weiterhin zeigten sich die replikationsdefekten T-Antigene der transformierten Hamsterzelllinie H65/90B (Defendi and Jensen, 1967) als besonders interessant, da sie zwar die Bindungsstelle I des SV40 "origin" binden und auch eine ATP-Bindung zeigen, nicht aber mehr die Bindungsstelle II des "origin" binden können und auch eine defekte ATPase-Aktivität aufweisen (Huber et al., 1985).

In dieser Arbeit sollte zunächst bestätigt werden, daß die transformierten Zellen VLM und H65/90B wie auch die anderen in der Diplomarbeit untersuchten Linien T-Antigene exprimieren, die replikationsdefekt sind. Ferner sollten weitere T-Antigene von transformierten Zelllinien auf ihre Fähigkeit zur DNA-Replikation hin getestet werden. Darüberhinaus sollten die integrierten viralen Genome der Zelllinien VLM und H65/90B kloniert und charakterisiert werden. Dabei sollte es möglich sein durch Kartierung, in vitro Rekombination und DNA-Sequenzierung die DNA-Strukturen dieser mutierten Genome aufzuklären.

2. MATERIAL

2.1 Zelllinien

Es wurden folgende tierische Zelllinien verwendet:

Rat2	Ratten-Fibroblastenzellen (Topp, 1981)
TC7	Affennierenzellen (Robb and Huebner, 1973)
COS-1	CV-1 Affennierenzellen, transformiert durch klonierte SV40 "origin"-Deletionsmutante (Stamm 776); (Gluzman, 1981)
VLM	Balb/c Mausembryozellen, transformiert durch SV40 (Baylor Stamm); (Zarling and Tevethia, 1973)
MKSA	Balb/c Mausnierenzellen, transformiert durch SV40 (Baylor Stamm); (Dubbs et al., 1967; Kit et al., 1969)
H65/90B	Tumorzelllinie von Syrischem Hamster, induziert durch ^{60}Co bestrahltes SV40 Virus (Baylor Stamm); (Defendi and Jensen, 1967)
THK-1t	Nierenzellen vom Syrischen Hamster, transformiert durch SV40 (Stamm 777); (Black and Rowe, 1963)
ELONA	Tumorzelllinie von nackten Mäusen, induziert durch die Hamster-Tumorzelllinie ELO (Brandner et al., 1977)
C0625	Embryozellen vom Chinesischen Hamster, transformiert durch SV40 (Stamm 777); (Lavi, 1981; Matz et al., 1985)
C0631	Embryozellen vom Chinesischen Hamster, transformiert durch SV40 (Stamm 777); (Lavi, 1981; Matz et al., 1985)

2.2 Medien

Die Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DME von Gibco, Europe) kultiviert.

Für die Zelllinien TC7, VLM, H65/90B, THK-1t und Rat2 enthielt das Medium zusätzlich 8% Newborn Calf Serum (NCS),

während für die Zelllinien COS-1, MKSA, ELONA, CO625 und CO631 5% Fetal Bovin Serum (FCS) zugegeben wurde.

DMEM

10 g/l MEM Dulbecco 1x (Gibco)
 40 mg/l Penizillin
 80 mg/l Streptomycin
 100 mg/l Kanamycin
 3.75 g NaHCO_3
 pH 6.8 (mit HCl eingestellt)

2.3 Bakterienstämme

Folgende Escherichia Coli Stämme wurden verwendet:

DH1 (D. Hanahan, 1983)

DK1 (B. Seed, 1984; pers. Mitteilung)

(DK1 = DH1 Lon A⁻)

Ferner wurden verwendet:

Staphylococcus aureus - Stamm Cowan 1 (Kessler et al., 1975)

2.4 Medien

LB-Medium

10 g/l Bacto-Trypton
 10 g/l Bacto-Hefeextrakt
 0.5% NaCl

pH 7.6-7.8 (mit NaOH eingestellt)

Für LB-Platten wurden 1.5% Bacto-Agar zugegeben. Zur Antibiotika-Selektion wurde den Platten Ampizillin bzw. Kanamycin (jeweils 50 µg/ml) zugesetzt.

Ψb-Medium

2% Bacto-Trypton
 0.5% Bacto-Hefeextrakt
 0.5% MgSO_4
 pH 7.6 (mit KOH eingestellt)

Für Ψa-Platten wurden 1.4% Bacto-Agar zugegeben.

2.5 Plasmide

Es wurden folgende Plasmide verwendet:

- pBR322 (Sutcliffe, 1978)
- pAT153 Derivat von pBR322, das durch Deletion der HaeIII B- und G-Fragmente (1646-2351) keine "poison sequence" mehr besitzt (Twigg and Sherratt, 1980)
- pSV-wt SV40-wt kloniert in die BamHI-Stelle von pAT153 (Fanning et al., 1982)
- pEP392 HindIII c-Fragment von SV40 ("origin of replication", 5171-1046) kloniert in die HindIII-Stelle von pAT153 (Fanning et al., 1982)
- p1097 ca-Mutante von SV40 mit einer Deletion der T-Antigen Bindungsstelle I (5171-5208) kloniert in die BamHI-Stelle von pAT153 (Di Maio and Nathans, 1982; Huber et al., 1985)
- pON-wt Synthetisches Oligonukleotid der T-Antigen Bindungsstelle I des SV40 (5191-5209) kloniert in die BamHI-Stelle von pAT153 (Ryder et al., 1985)
- pK1 SV40-wt (Stamm 776) kloniert in die EcoRI-Stelle von pMK16#6 (Gluzman and Ahrens, 1982); pMK16#6 ist ein Derivat von pMK16 (Kahn et al., 1979), das eine Deletion im Tetrazyklin-Gen aufweist und keine BamHI- bzw. BglI-Restriktionsstelle besitzt
- pUC9 (Vieira and Messing, 1982)
- pIn-1-13 Replikationsdefekte SV40 Mutante In-1 mit einer Baseninsertion an der Stelle 5243 (Tegtmeyer et al., 1984), kloniert in die BamHI-Stelle von pSDL13 (Levinson et al., 1984; B. Schnierle, Diplomarbeit, Uni München, 1986)

2.6 Antikörper

Der monoklonale Anti-T Antikörper Pab 108 IgG (Gurney et al., 1986) wurde von B. Vogt und S. Dehde, Universität München, gereinigt und zur Verfügung gestellt. Der mit Meerettich-Peroxidase gekoppelte Anti-Maus Antikörper stammte von der Firma Dakopatts GmbH, Hamburg, während der Biotin-markierte Anti-Maus Antikörper von der Firma Amersham und Buchler, Braunschweig, bezogen wurde.

2.7 Enzyme

Restriktionsenzyme

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von den Firmen New England Biolabs, Schwalbach; Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim; Pharmacia, Freiburg bezogen.

Andere Enzyme

Firma Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

alkalische Phosphatase, DNA Polymerase I, T4-DNA Ligase

Firma New England Biolabs, Schwalbach

DNA Polymerase I, T4-DNA Ligase, T4-Polynukleotidkinase

Firma E. Merck AG, Darmstadt

Proteinase K aus Pilzen

Firma Pharmacia, Freiburg

Desoxyribonuklease I, DNA Polymerase I (Klenow-Fragment)

Firma Serva, Heidelberg

Lysozym, Ribonuklease A

2.8 Chemikalien und andere Materialien

Firma Amersham und Buchler, Braunschweig

α - ^{32}P -dCTP (3000 Ci/mmol), α - ^{35}S -dATP (650 Ci/mmol),
 γ - ^{32}P -ATP (3000 Ci/mmol)

Streptavidin-Meerettich-Peroxidase Komplex

Firma Baker Chemicals, Deventer, Holland

Lipoluma, Lumasolve

Firma Biochrom KG, Berlin

Fötale Kälberserum, Serum neugeborener Kälber

Firma Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

Bacto-Agar, Hefe-Extrakt, Trypton

Firma Fluka Feinchemikalien, Neu-Ulm

3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid,

3,3'-Dimethoxybenzidin (o-Dianisidin), Wasserstoffperoxid

Firma Gibco Europe GmbH, Karlsruhe

DME, Fötale Kälberserum, Serum neugeborener Kälber

Firma Kodak Limited

Röntgenfilme X-Omat S und XAR-5

Firma E. Merck AG, Darmstadt

Ammoniumazetat, Borsäure, 1-Butanol, Kalziumchlorid,
 Chloroform, Diethlether, Dinatriumhydrogenphosphat,
 Dimethylsulfoxid (DMSO), Äthylen-dinitrilo-tetraessigsäure
 (EDTA), Ethanol p.A., Essigsäure p.A., Glucose, Glycerin,
 Glycin, Harnstoff, Isoamylalkohol, 2-Propanol,
 Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumazetat,
 Lithiumchlorid, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat,
 2-Mercaptoethanol, Methanol, Natriumazetat, Natriumazid,
 Natriumcarbonat, Natriumchlorid, Natriumzitrat,
 Natriumdihydrogenphosphat, Natriumdodecylhydrogensulfat
 (SDS), Natriumhydrogencarbonat, Natriumhydroxid,
 Natriumtetraborat, Phenol, Polyethylenglykol (PEG 1000),
 Phosphorsäure 85%, Salzsäure 25%, Saccharose,
 Trichloressigsäure, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris),
 Zinkchlorid

Firma Nunc GmbH, Wiesbaden

Gewebekulturschalen

Firma Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg

DEAE-Dextran, Dextran-Sulfat, Ficoll 400, Protein-A
Sepharose CL-4B, Sephadex G50

Firma Serva, Heidelberg

Acrylamid, Ammoniumperoxidisulfat, Ampizillin,
Bromphenolblau, Ethidiumbromid, Kanamyzin,
N,N'-bis-methyl-acrylamid, Penizillin, Streptomyzin,
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylen-diamin (TEMED),
Triton X-100, Trypsin, Xylencyanol

Firma Sigma

Adenosin-5'-triphosphat (ATP), Agarose,
2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP),
2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat (dCTP),
2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat (dGTP),
Dithiothreitol (DTT), Glykogen,
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (Hepes),
2(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES), Nonidet P-40,
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF),
Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure) (PIPES),
Polyvinylpyrrolidon, Rinderserumalbumin, Spermidin,
Triethanolamin, Thymidin-5'-triphosphat (TTP), Tween 20

2.9 Puffer und LösungenPuffer für Restriktionsenzyme

Puffer:	Restriktionsenzyme:
6 mM Tris-HCl, pH 7.4	KpnI
10 mM NaCl	
6 mM MgCl ₂	
6 mM MeEtOH	
0.05% Triton	
6 mM Tris-HCl, pH 7.4	PstI
50 mM NaCl	BglI
6 mM MgCl ₂	BglII
6 mM MeEtOH	HindIII
0.05% Triton	SphI
8 mM Tris-HCl, pH 8.0	BamHI
150 mM NaCl	SalI
6 mM MgCl ₂	DpnI
6 mM MeEtOH	NcoI
0.05% Triton	BstXI
100 mM Tris-HCl, pH 7.4	EcoRI
50 mM NaCl	
6 mM MgCl ₂	
0.05% Triton	
50 mM Tris-HCl, pH 8.0	NdeI
50 mM NaCl	
10 mM MgCl ₂	
0.05% Triton	

Trypsinlösung

8.9 g NaCl

0.2 g KCl

0.2 g KH_2PO_4 1.25 g Na_2HPO_4

1.25 g Trypsin (Serva 1:250)

1.25 g EDTA

in 800 ml H_2O bidest. gelöst;0.1 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ 0.1 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$

in 200 ml H_2O bidest. gelöst, dann beide Lösungen
zusammengemischt und steril filtriert.

Tris-Saline-Lösung

Für 6 Liter:

40 g NaCl

1.9 g KCl

0.5 g Na_2HPO_4

15 g Tris

pH 7.4-7.5

0.5 g MgCl_2 0.5 g CaCl_2 2x HBS

280 mM NaCl

1.5 mM Na_2HPO_4

50 mM Hepes

pH 7.08

STE-Lösung

0.5% SDS

0.1 M Tris-HCl, pH 7.5

0.04 M EDTA, pH 7.0

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 8.0

1 mM EDTA

PBS-Puffer

Für 1 Liter:

8.76 g NaCl

0.37 g KCl

0.275 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 4.513 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ pH 7.35 (eingestellt mit 0.5 M NaH_2PO_4)Zellen-Lysispuffer I

3% Sarkosyl

0.075 M Tris-HCl, pH 8.0

0.025 M EDTA, pH 8.0

Hanks-Puffer

Für 1 Liter:

80.0 g NaCl

4.0 g KCl

1.0 g MgCl_2 1.0 g MgSO_4 1.4 g CaCl_2 0.6 g Na_2HPO_4

10.0 g Glucose

0.6 g KH_2PO_4 0.35 g NaHCO_3

vor dem Autoklavieren 1:10 verdünnt

10x Ligase-Puffer

500 mM Tris-HCl, pH 7.8

100 mM MgCl_2

200 mM Dithiothreitol

Elektrophoresepuffer (Tris-EDTA-Borat-Puffer)

100 mM Tris

2.5 mM EDTA

(mit Borsäure auf pH 8.3 eingestellt)

NETI-Puffer

0.15 M NaCl

0.1 mM EDTA

20 mM Tris-HCl, pH 8.0

"High Salt" NET-Puffer

1.0 M NaCl

0.1 mM EDTA

20 mM Tris-HCl, pH 8.0

Denaturierungspuffer

1.5 M NaCl

0.5 M NaOH

Neutralisierungspuffer

1.5 M NaCl

0.5 M Tris-HCl, pH 7.4

20x SSC-Puffer

3.0 M NaCl

0.3 M Natriumzitat

DNAse-Lösung

1 mg DNAse pro ml

0.01 M Tris-HCl, pH 7.5

0.01 M CaCl₂0.01 M MnCl₂DNAse-Verdünnungspuffer

0.01 M Tris-HCl, pH 7.5

0.001 M MnCl₂Stop-Lösung

Für 100 µl:

25 µl 0.25 M EDTA, pH 7.2

50 µl Kalbathymus DNA (4 mg/ml)

25 µl 10% SDS

Vorhybridisierungslösung

50% Formamid
 4x SSC
 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6.5
 0.1% Ficoll
 0.1% Polyvinylpyrrolidon
 0.1% Rinderserumalbumin
 400 ug/ml denaturierte Hefe-RNA

Hybridisierungslösung

50% Formamid
 4x SSC
 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6.5
 0.02% Polyvinylpyrrolidon
 0.02% Rinderserumalbumin
 10% Dextransulfat
 400 ug/ml Hefe-RNA (denaturiert)
 1 ug DNA-Probe (nick-translatiert und denaturiert)

10x Annealing-Puffer

70 mM Tris-HCl, pH 7.5
 70 mM MgCl₂
 300 mM NaCl
 100 mM DTT
 1 mM EDTA

TfbI-Puffer

30 mM Kaliumazetat
 100 mM RbCl₂
 10 mM CaCl₂
 50 mM MnCl₂
 15% Glycerin
 pH 5.8 (mit 0.2 M Essigsäure eingestellt)

TfbII-Puffer

10 mM PIPES

75 mM CaCl_2 10 mM RbCl_2

15% Glycerin

pH 6.5 (mit KOH eingestellt)

Lysozym-Lösung

4 mg Lysozym pro ml

50 mM Glucose

10 mM EDTA

25 mM Tris-HCl, pH 8.0

Kaliumazetat-Lösung (pH 4.8)

Für 100 ml:

60 ml 5 M Kaliumazetat

11.5 ml Eisessig

28.5 ml H_2O bidest.

(Diese Lösung ist 3 M bezüglich Kalium und 5 M bezüglich Azetat)

Bakterien-Aufschlußpuffer

50 mM Tris-HCl, pH 8.0

62.5 mM EDTA

0.2% Triton-X-100

Dialysepuffer (I,II)

I 10 mM Tris-HCl, pH 8.0

1 mM EDTA

1 M NaCl

II 10 mM Tris-HCl, pH 8.0

1 mM EDTA

Zellen-Lysis-puffer II

50 mM Tris-HCl, pH 8.0

120 mM NaCl

0.5% Nonidet P-40

NETII-Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 7.5
 150 mM NaCl
 5 mM EDTA
 0.5% Nonidet P-40

Puffer A

10 mM Hepes, pH 7.8
 5 mM KCl
 1 mM DTT
 0.5 mM MgCl₂
 1 mM PMSF

Sample-Puffer

0.125 M Tris-HCl, pH 8.3
 20% Glycerin
 4% SDS
 10% 2-Mercaptoethanol
 0.001% Bromphenolblau

ATPase-Reaktionspuffer (I,II,III,IV,V)

I 10 mM MRS, pH 6.2
 10 mM NaCl
 4 mM MgCl₂
 II Puffer I + 0.1% Nonidet P-40
 III (Extraktionspuffer)
 10 mM Tris-HCl, pH 8.0
 10 mM NaCl
 IV 1 M LiCl
 10 mM Tris-HCl, pH 8.0
 100 mM NaCl
 0.5% Nonidet P-40
 V 25 mM PIPES, pH 7.0
 100 mM NaCl
 5 mM MgCl₂
 0.01% Nonidet P-40

3. METHODEN

3.1 Zellkultivierung

Alle Zellen wurden auf kollagenbeschichteten Plastikpetrischalen (140 mm Durchmesser, Firma Nunc GmbH) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach jeweils 3-4 Tagen wurden die Zellen passagiert, indem sie 5 min bei 37°C mit 0.1% Trypsinlösung (Serva) inkubiert wurden, anschließend durch kurzes Abzentrifugieren pelletiert, in etwas Medium resuspendiert und auf Platten mit frischem DME und entsprechendem Serum verteilt wurden.

3.2 Zellfusion

Von den SV40 transformierten Zelllinien VLM, MKSA, THK-1t, H65/90B, ELONA, C0625 und C0631 wurden jeweils 1×10^5 Zellen zusammen mit COS-1 oder TC7 Zellen (jeweils 2×10^5 Zellen) auf einer 100 mm Zellkulturplatte ausgesät. Die Zellen wurden 24 h in DME + 5% FCS kokultiviert, ehe die Fusion durchgeführt wurde. Die Zellen wurden zweimal mit warmen (37°C) DME gewaschen und anschließend mit 2 ml einer PEG-Lösung (50% in DME) vorsichtig überschichtet. Nach 1 min wurde die PEG-Lösung abgezogen und zweimal mit einer 15% Dimethyl-Sulfoxid-Lösung (DMSO) nachgewaschen. Restliches DMSO wurde durch Nachwaschen mit DME entfernt. Die Zellen wurden anschließend bei 37°C/5% CO₂ in DME + 5% FCS inkubiert. (Botchan et al., 1979)

3.3 DNA-Transfektion von tierischen Zellen

Um tierische Zellen mit DNA zu transfizieren wurden zwei Methoden verwendet, wobei die DEAE-Dextran Methode für Expressions- bzw. Replikationsexperimente benutzt wurde. Die Kalziumphosphat-Kopräzipitationsmethode wurde dagegen angewandt um transformierte Rat2 Zelllinien zu etablieren.

3.3.1 DEAE-Dextran Methode

Halbkongfluente 100 mm Zellkulturplatten (1×10^6 Zellen pro Platte) wurden zweimal mit vorgewärmter Tris-Saline-Lösung gewaschen. Anschließend wurde jeweils 500 μ l einer DEAE-Dextran (500 μ l/ml) Tris-Saline-Lösung, welche die zu transfizierende DNA enthielt, gleichmäßig auf den Zellen verteilt. Die Platten wurden dann 60 min bei 37°C inkubiert. Nach vorsichtigem Abziehen der DEAE-Dextranlösung wurden die Zellen mit Tris-Saline-Lösung nachgewaschen, mit frischem Medium (DMEM + 5% FCS) versehen und bei 37°C/5% CO₂ inkubiert. (McCutchan and Pagano, 1968)

3.3.2 Kalziumphosphat-Koppräzipitationsmethode

Halbkongfluente 60 mm Zellkulturplatten (3×10^5 Rat2 Zellen pro Platte) wurden 2 h vor der Transfektion mit frischem Medium versehen. Inzwischen wurde die Transfektion vorbereitet, indem 5 μ g der zu transfizierenden, linearisierten DNA ethanolpräzipitiert, in 217 μ l TE pH 7.08 aufgenommen und mit 33 μ l 2 M CaCl₂ versetzt wurden. Diese Lösung wurde tröpfchenweise zu 250 μ l 2x HBS gegeben, das gleichzeitig ständig am Vortex gemischt wurde. Hierbei entstand ein feines Präzipitat. Diese Suspension wurde 15 min bei Raumtemperatur stehengelassen, und nachdem das Medium entfernt war, den Zellen zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurde den Zellen zusätzlich 5 ml Medium zugeführt. Nach einer weiteren Inkubation von 4 h wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 1 ml einer 20% Glycerinlösung versehen und 3 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Tris-Saline-Lösung gewaschen, mit frischem Medium (DMEM + 8% NCS) versehen und bei 37°C/5% CO₂ inkubiert. (Pellicer et al., 1980; Graham and Van der Eb, 1973)

3.4 Transformation von Rattenzellen (Rat2)

Rat2 Zellen, die durch die Kalziumphosphat-Kopräzipitationsmethode mit DNA transfiziert worden waren, wurden etwa 24 h danach 1:6 passagiert. Die Zellen wurden dann bis zu 20 Tagen inkubiert, wobei alle 3 Tage das Medium gewechselt wurde. Nach 12-15 Tagen wurden die Zellen jeweils einer Platte mit Giemsa-Lösung (Merck Art. 9204, 1:10 verdünnt mit heißem Leitungswasser) angefärbt. Dadurch wurden die entstehenden Foci deutlich sichtbar (Abb. 21). Die Foci auf den übrigen, nicht angefärbten Platten wurden nach 18-20 Tagen einzeln mit Hilfe von Klonierringen abtrypsiniert und in Weichagar ausgesät. Dazu wurden zuerst 4 ml einer 0.6% Agarose/1x DME/10% FCS Mischung als Boden in einer Zellkulturplatte gegossen. Etwa 200 Zellen eines Focus wurden nun mit 5 ml 0.3% Agarose/1x DME/10% FCS gut vermischt und auf die vorbehandelte Platte gegeben. Die Zellen wurden dann 2-3 Wochen inkubiert, wobei sie zweimal pro Woche mit 3 ml 0.3% Agarose/1x DME/10% FCS gefüttert wurden. Nach etwa 2 Wochen waren die Weichagarklone als helle Punkte zu erkennen und konnten mit einer Pasteurpipette aus dem Weichagar entnommen werden. Die Klone wurden dann auf eine 20 mm Zellkulturplatte gegeben und in normalem Medium (DME + 8% NCS) hochgezogen. (Crowe et al., 1983)

3.5 Isolierung chromosomaler DNA aus tierischen Zellen

Die Mengenangaben beziehen sich auf fast konfluente 140 mm Zellkulturplatten. Die Zellen wurden fünfmal mit warmer (37°C) Tris-Saline-Lösung (S. 19) gewaschen und anschließend mit 0.15 ml vorinkubierter Proteinase K-Lösung (5 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 7.2) und 1 ml STE-Lösung (S. 19) versehen. Anschließend wurden die Platten bei Raumtemperatur etwa 10 min leicht bewegt und die viskose Lösung nach Überführen in ein Zentrifugenröhrchen 2 h bei

37°C inkubiert. Dann erfolgte eine zweimalige, vorsichtige Phenolextraktion und fünfmalige Etherextraktion. Nach 2 Tagen Dialyse gegen 5 mM Tris-HCl, pH 7.5 wurde vorinkubierte RNase-Lösung (200 µg/ml in 5 mM Tris-HCl, pH 7.5) zu einer Endkonzentration von 20 µg/ml zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 0.1 Volumen an 2 M NaCl in 55 mM Tris-HCl, pH 7.5 wurde nochmals 1 h bei 37°C und anschließend 0.02 Volumen an Proteinase K-Lösung zugesetzt (Endkonzentration 100 µg/ml, Inkubation 1 h, 37°C). Phenol- und Etherextraktion wurden wiederholt und die wäßrige Phase 2 Tage gegen TE pH 7.5 dialysiert. (nach Sutter et al., 1978)

Die Konzentration der DNA wurde schließlich durch Messung der Absorption bei 260 nm in einem Spektralphotometer bestimmt - 1 OD₂₆₀=50 µg DNA/ml. (nach Vinograd et al., 1963)

In einer weiteren Methode wurden die Zellen einer fast konfluenten 140 mm Platte trypsiniert und durch kurzes Zentrifugieren pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml PBS-Puffer (S. 20) resuspendiert und nach Zugabe von 1 ml Lysispuffer I (S. 20) und 100 µl Proteinase K-Lösung (5 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 7.2) 2-3 h bei 37°C inkubiert. Zur Isolierung der DNA wurde die viskose Lösung dann dreimal mit gleichem Volumen Phenol und anschließend zweimal mit gleichem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Die Phasen wurden jeweils durch 10 minütiges Zentrifugieren bei 4°C und 1500 rpm getrennt. Die wäßrige Phase wurde dann mit 0.1 Volumen 3 M Natriumazetat versetzt, gut durchmischt und mit gleichem Volumen Isopropanol überschichtet. Durch langsames Verrühren der Phasengrenze mit einer zugeschmolzenen Pasteurpipette wurde die DNA aufgewickelt. Nach kurzem Trocknen und vorsichtigem Waschen mit 70% Ethanol wurde die DNA unter leichtem Drehen der Pasteurpipette in TE pH 8.0 gelöst. Die Konzentration der DNA wurde schließlich photometrisch bestimmt. (M. Lipp, pers. Mitteilung)

3.6 Isolierung niedermolekularer DNA aus tierischen Zellen

Die Zellen einer 100 mm Platte wurden mit kalter (4°C) Hanks-Lösung gewaschen, nach Zugabe von 2.5 ml TE pH 7.5 abgeschabt und in ein Corex-Zentrifugenröhrchen überführt. Zum Aufschluß der Zellen wurden 150 µl einer 10%igen SDS-Lösung zugegeben und der Ansatz 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zusatz von 150 µl vorinkubierter Proteinase K-Lösung (5 mg/ml in 10 mM Tris, pH 7.2) wurde nochmals 90 min bei 37°C inkubiert und anschließend 0.25 Volumen 5 M NaCl vorsichtig unter leichtem Drehen des Röhrchens beigemischt. Das Lysat wurde bei 4°C über Nacht stehengelassen, wobei Zelltrümmer und hochmolekulare DNA ausfielen. Nach 90 min Zentrifugation bei 4°C/15000 rpm konnte der Überstand, welcher die niedermolekulare DNA enthielt, gewonnen werden und daraus durch Zugabe von 2.5 Volumen Ethanol die DNA präzipitiert werden. Das DNA-Pellet wurde in TE aufgenommen, phenolisiert und mit Ether extrahiert. Nach einer weiteren Fällung mit Ethanol wurde die DNA in TE gelöst, restriktionsverdaut oder unmittelbar in Gelelektrophoresen eingesetzt. (nach Hirt, 1967)

3.7 Enzymatische Reaktionen mit DNA

3.7.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen wurde in den entsprechenden Verdauungspuffern (S. 18) durchgeführt. Pro 1 µg Plasmid-DNA wurden 1-2 Enzymeinheiten eingesetzt, während für genomische DNA 4-8 Einheiten verwendet wurden. Plasmid-DNA wurde dabei 1-2 h, genomische DNA dagegen 6-10 h bei entsprechender Temperatur inkubiert. Die Verdauung wurde schließlich durch zehnmütiges Inkubieren bei 65°C gestoppt, und die DNA nach Ethanolfällung in einem gewünschten Volumen TE aufgenommen.

3.7.2 Abspaltung von 5'-Phosphaten durch alkalische Phosphatase

Durch Restriktionsendonukleasen wird die Phosphorsäurediesterbindung der DNA so gespalten, daß am 3' Ende eine Hydroxylgruppe und am 5' Ende ein Phosphorsäuremonoester (5' Phosphat) entsteht. Oftmals ist es jedoch wünschenswert, auch am 5' Ende eine freie Hydroxylgruppe zu haben (z.B. radioaktive Markierung am 5' Ende, Verhinderung der intramolekularen Verknüpfung von DNA-Enden); dies kann mit dem Enzym alkalische Phosphatase erreicht werden.

Dazu wurde die alkalische Phosphatase folgendermaßen vorbereitet: 10 µl = 40 Units wurden 1 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 0.5 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM ZnCl₂ resuspendiert, anschließend 2 h gegen den selben Puffer dialysiert und bei 4°C aufbewahrt (Konzentration 80 Units/ml).

Die zu dephosphorylierende DNA wurde in 50 µl TE pH 7.6 gelöst. Dann wurden 5 µl 1 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 µl 100 mM ZnCl₂, 0.5 µl 1 M MgCl₂ und 10 µl vorbehandelte alkalische Phosphatase zugegeben. Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend 10 min auf 65°C erhitzt. Wurde die dephosphorylierte DNA für eine Ligasereaktion verwendet, so wurde die alkalische Phosphatase über eine Gelelektrophorese abgetrennt (s. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, S. 32); wurde die DNA dagegen am 5' Ende radioaktiv markiert, so wurde der Ansatz mit 5 µl 0.5 M EDTA, pH 8.0, 190 µl TE, 260 µl Phenol und 260 µl Chloroform versetzt und extrahiert. Anschließend wurde viermal mit Ether extrahiert, die DNA in der wäßrigen Phase ethanolpräzipitiert und zweimal gewaschen und schließlich das Pellet getrocknet. (nach Maniatis et al., 1982)

3.7.3 Phosphorylierung von 5' Hydroxylgruppen mit Polynukleotidkinase

Die Auffüllung der 5' Enden von dephosphorylierter DNA mit radioaktivem Phosphat wird mit Hilfe des Enzyms T4-Polynukleotidkinase durchgeführt.

Das DNA Pellet wurde in 5 μ l TE aufgenommen und mit 35 μ l einer Lösung aus 20 mM Tris-HCl, pH 9.5/1 mM Spermidin/0.05 mM EDTA versehen. Nach 5 min Erhitzen bei 60°C und anschließendem Abkühlen wurden 5 μ l einer Lösung aus 0.5 M Tris-HCl, pH 9.5/110 mM MgCl₂/50 mM DTT/50% Glycerin zugegeben, gut gemischt und mit 2 μ l (=4 Units) Polynukleotidkinase und 10 μ l γ -³²P-ATP (3000 Ci/mmol) versetzt. Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Ethanolfällung und zweimaligem Waschen wurde das Pellet leicht getrocknet. (nach Maniatis et al., 1982)

3.7.4 Verknüpfung von DNA-Fragmenten durch Ligase-Reaktion

Um mit einem DNA-Molekül erfolgreich Bakterien transformieren zu können, mußte die "fremde" DNA mit dem Vektorfragment in einer Ligase-Reaktion verbunden werden. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert betrug etwa 1:4, das Reaktionsvolumen 10 μ l und die Gesamt-DNA-Menge mindestens 0.2 μ g. Nach Zugabe von 1 μ l 10x Ligase Puffer (S. 20) wurde die Mischung 10 min bei 60°C erhitzt und dann langsam bei Raumtemperatur abgekühlt. Schließlich wurden 1 μ l 10 mM ATP, pH 7.8 und 1 μ l T4 DNA Ligase zugegeben und der Ansatz 14-18 h bei 16°C inkubiert.

3.8 Charakterisierung von DNA

3.8.1 Auftrennung von DNA in Agarosegelelen

Zur Trennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese angewandt. Hierbei wurden horizontale Agarosegele (15 x 20 x 0.5 cm) bzw. Agarose-Minigele verwendet, wobei die Agarosekonzentration je nach Größe der DNA-Fragmente

0.6-2% betrug. Als Elektrophoresepuffer wurde ein Tris-EDTA-Borat-Puffer (S. 20) verwendet. Im Falle der großen Gele erfolgte die Elektrophorese 14-16 h bei ca. 40 V, im Falle der Minigele 40-60 min bei ca. 130 V. Im Anschluß davon wurden die Gele 5-10 min in einer Ethidiumbromidlösung (20 mg/l) angefärbt, kurz mit H₂O gewaschen und über UV-Licht (254 nm) mit einer Polaroidkamera photographiert.

3.8.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit DEAE-Zellulose-Membranen (Schleicher + Schuell NA-45) durchgeführt. Die Membranen wurden 10 min in 10 mM EDTA, pH 7.6, 5 min in 0.5 M NaOH und mehrmals kurz in H₂O bidest. gewaschen, wo sie bei 4°C aufbewahrt werden konnten. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der restriktionsverdauten DNA und anschließender Ethidiumbromid Färbung des Gels, wurde unmittelbar vor dem zu isolierenden Fragment (in Wanderrichtung der DNA) das Gel eingeschnitten. In den Einschnitt wurde ein DEAE-Zellulose-Membranstreifen eingesetzt und die Elektrophorese fortgesetzt, bis die DNA vollständig an dem Membran gebunden war. Dies konnte mit Hilfe einer langwelligen UV-Lampe (366 nm) kontrolliert werden. Die Membran wurde dann durch vorsichtiges Schütteln in einem Eppendorfgefäß mit NET1-Puffer von der restlichen Agarose befreit. Zur DNA Elution wurde die Membran in 150 µl-250 µl "High-Salt" NET-Puffer 60 min bei 68°C inkubiert und gelegentlich vorsichtig am Vortex gemischt. Um das Ethidiumbromid zu entfernen wurde die DNA einmal mit 3 Volumen wassergesättigtem n-Butanol extrahiert und anschließend mit 2.5 Volumen Ethanol präzipitiert. Um störendes NaCl zu entfernen wurde die DNA in TE gelöst und nochmals mit 0.1 Volumen Natriumazetat und 2.5 Volumen Ethanol gefällt. Die Effizienz der Elution und die Identität des Fragments wurden anschließend durch die Elektrophorese

eines Aliquots auf einem Agarose Minigel geprüft, wobei auch die DNA-Konzentration abgeschätzt werden konnte.

(P.M. Lizardi; Schleicher + Schuell Application Update; nach Dretzen et al., 1981)

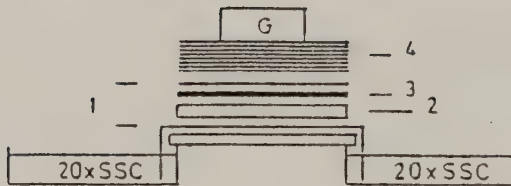
3.8.3 Transfer von DNA aus Agarosegelen auf Nitrozellulose

Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA im Agarosegel mußte sie zu Einzelsträngen denaturiert werden. Hierzu wurde das Gel 30 min in 400 ml Denaturierungspuffer (S. 21) leicht bewegt, ehe es wiederum 30 min mit 400 ml

Neutralisationspuffer (S. 21) behandelt wurde. Das Nitrozellulose-Filter (BA-85, Schleicher + Schuell) wurde in der entsprechenden Größe des Gels zugeschnitten und in 20x SSC Puffer (S. 21) getränkt, ebenso die benötigten 3MM-Whatman-Papiere. Der Aufbau der Apparatur zum Transfer wird in Abb. 4 gezeigt. Durch Hochsaugen des 20x SSC Puffers (1-2 Tage lang) wurde die einzelsträngige DNA auf das Nitrozellulose-Filter transferiert, wo sie durch zweistündiges Backen bei 80°C fest gebunden wurde. (Southern, 1976)

3.8.4 Nick-Translation

Um 1 µg Plasmid DNA mit $Q^{32}PdCTP$ (spez. Aktivität 3000 Ci/mmol) zu markieren, wurde folgendermaßen verfahren: Aus 0.1 mM Stammlösungen von dATP, dGTP und dTTP wurden jeweils 2.5 µl in das Reaktionsgemisch eingesetzt, ebenso wie 5-10 µl $Q^{32}PdCTP$, das 50-100 uCi entsprach. Hinzugefügt wurden 1 µg Plasmid DNA, 1.5 µl 1 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 µl 1 M $MgCl_2$ und 1 µl einer DNAse-Lösung (S. 21). Die DNAse-Lösung war vorher 1:10 in DNAse-Verdünnungspuffer (S. 21) und danach 1:1000 in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 verdünnt worden. Der Ansatz wurde eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Nick-Translation durch Zusatz von 1 µl DNA-Polymerase I



- 1 = 3MM Whatman
- 2 = Agarosegel
- 3 = Nitrozellulose
- 4 = Saugpapier
- G = Gewicht

Abb. 4: Schematische Darstellung der Apparatur für den Transfer von DNA aus Agarosegelen auf Nitrozellulosefilter

(5-10 Units) gestartet wurde. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 16°C wurde die Reaktion gestoppt, indem 20 µl Stoplösung (S. 21) zugegeben wurden.

Die Abtrennung der nicht eingebauten dNTP's erfolgte durch eine Sephadex G50 Säule. Dazu wurde eine blaue Eppendorfspitze unten mit Glaswolle verstopft, mit Sephadex G50 (in TE) aufgefüllt und in ein unten abgeschnittenes Eppendorfgefäß gesteckt. Dieses wiederum wurde in ein intaktes Gefäß gesteckt und das Ganze in einem Zentrifugenröhrchen eine Minute zentrifugiert. Dann wurden 150 µl Hefe-RNA (10 µg/ml) auf die Säule gegeben, 3 min zentrifugiert und das Eluat verworfen. Nach Zugabe von 150 µl TE und erneuter, einminütiger Zentrifugation war die Säule bereit zur Abtrennung der Nukleotide.

Hierzu wurden etwa 70 µl TE zum Nick-Translations-Ansatz zugesetzt, dieser auf die Säule gegeben und 5 min in einem Plastikröhrchen zentrifugiert. Die radioaktiv markierte DNA fand sich im Eluat, während die nicht eingebauten dNTP's durch die Säule abgefangen wurden.

Der Einbau der Radioaktivität wurde quantitativ bestimmt, indem 1 µl des Bluats zusammen mit 5% Trichloressigsäure und 50 µg Kalbathymus DNA 20 min im Eisbad inkubiert und über einem Glasfaserfilter abgesaugt wurde. Der getrocknete Filter wurde dann in eine Szintillationslösung (Lipoluma: Lumasolve (Baker):H₂O = 10:1:0.2) gelegt und die Aktivität bestimmt; diese betrug $1-3 \times 10^5$ cpm/µg DNA. (Rigby et al., 1977)

3.8.5 Hybridisierung

Zur Identifizierung homologer DNA Sequenzen wurde die am Nitrozellulose-Filter gebundene DNA gegen eine entsprechende nick-translatierte, radioaktive DNA hybridisiert. Hierzu wurde zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen das Nitrozellulose-Filter zunächst mit 30 ml Vorhybridisierungs-lösung (S. 22) in einer Plastiktüte eingeschweißt und 12-14 h bei 42°C inkubiert. In der eigentlichen Hybridisierung

wurde dann das Filter zusammen mit 30 ml Hybridisierungslösung (S. 22) und denaturierter nick-translatierter DNA in einer Plastiktüte für 15-20 h bei 42°C inkubiert. Zur Entfernung nicht- bzw. unspezifisch gebundener, markierter DNA wurde das Filter anschließend 2x 10 min in 2x SSC/0.1% SDS bei Raumtemperatur geschwenkt und schließlich 2x 30 min in 0.1x SSC/0.1% SDS bei 58°C gewaschen. (Wahl et al., 1979)

Nach Lufttrocknen des Filters konnte dann eine Autoradiographie erstellt werden. Hierzu wurde in einer Dupont Cronex Hi-Plus Cassette ein Kodak X-Omat S- bzw. X-Omat AR Film auf das Filter gelegt und bei -70°C, je nach Aktivität unterschiedlich lang, exponiert.

3.8.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA Fragmenten wurde nach dem Dideoxyverfahren an doppelsträngiger DNA durchgeführt. (Wallace et al., 1981; Chen and Seeburg, 1985)

Die DNA wurde nach der Methode der Dichtegradientenzentrifugation (S. 39) präpariert. Das Volumen von 2 µg DNA wurde getrocknet und anschließend die DNA mit 40 µl einer Lösung aus 0.2 M NaOH und 0.2 mM EDTA, pH 8.0 für 5 min bei Raumtemperatur denaturiert. Danach wurde die DNA durch Zugabe von 4 µl 2 M Natriumazetat, pH 4.5 neutralisiert und schließlich mit 96% Ethanol und entsprechendem Natriumazetat präzipitiert. Für die Annealing-Reaktion wurde die getrocknete DNA in einem Volumen von 15 µl, das 10x Annealing-Puffer (S. 22), 2.5 pMol Primer und ca. 16 µCi 32 S-dATP enthielt, aufgenommen. Für DNA Fragmente, kloniert in pAT 153, wurde ein EcoRI-Primer (New England Biolabs) verwendet, während für pUC 9 Klone der pUC-Universalprimer bzw. Reverse Primer eingesetzt wurde. Der Ansatz wurde für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 2 units Klenow-Polymerase zugesetzt und der Ansatz auf vier Eppendorfgefäße, die 2 µl der entsprechenden

dNTP/ddNTP Mischung (S. 37) für die vier Nukleotide enthielten, verteilt.

Die Reaktion wurde 20 min bei 30°C und anschließend mit 1 µl "Chase"-Lösung (0.125 mM dNTP) pro Gefäß für weitere 15 min inkubiert. Die Proben wurden dann unter Vakuum getrocknet, in 4 µl Formamid-Farbstoff-Mix (98% Formamid, 10 mM EDTA, pH 8.0, 0.2% Bromphenolblau und 0.2% Xylencyanol) aufgenommen und auf dem Sequenzgel aufgetragen. Das Gel war ein 6%iges Polyacrylamidgel mit 8 M Harnstoff. Die Gelelektrophorese erfolgte 2-3 h bei 3000 Volt und 70°C. Als Elektrophoresepuffer wurde ein Tris-EDTA-Borat Puffer (S. 20) verwendet. Im Anschluß daran wurde der Harnstoff mit 10% Essigsäure ausgewaschen, das Gel bei 80°C getrocknet und schließlich eine Autoradiographie erstellt.

µM	A-Mix	C-Mix	G-Mix	T-Mix
dTTP	100	100	100	5
dCTP	100	10	100	100
dGTP	100	100	5	100
ddGTP	-	-	120	-
ddCTP	-	100	-	-
ddATP	100	-	-	-
ddTTP	-	-	-	-

3.9 Klonierung und Identifizierung von rekombinanten Plasmiden

3.9.1 Herstellen von transformationskompetenten Bakterien

Bakterien der *E. coli*. Stämme DHI bzw. DKI wurden frisch auf Ψ a Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit einer Einzelkolonie wurde dann eine 5 ml Kultur in Ψ b Medium angeimpft und bei 37°C bis zu einer $OD_{578}=0.3$ stark geschüttelt. Mit dieser Vorkultur wurde anschließend eine 100 ml Hauptkultur (Ψ b Medium) inokuliert und weiter inkubiert bis zu einer $OD_{578}=0.48$.

Nach fünfminütigem Abkühlen auf Eis wurden die Bakterien abzentrifugiert (6000 rpm/4°C) und in 40 ml eiskaltem TfbI-Puffer (S. 22) suspendiert. Nach weiteren 5 min auf Eis wurden die Zellen erneut sedimentiert und in 4 ml eiskaltem TfbII-Puffer (S. 23) resuspendiert. Nachdem die Bakterien-suspension weitere 15 min im Eisbad inkubiert wurde, konnten passende Aliquots (100-200 μ l) in vorgekühlte Eppendorffgefäße abgefüllt werden. Die Bakterien wurden entweder direkt zur Transformation benutzt oder mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt. (nach Hanahan, 1983)

3.9.2 Transformation von Bakterien

Pro 200 μ l kompetenter Bakterien (eventuell bei 0°C aufgetaut) wurden jeweils 0.1-0.3 μ g ligierter DNA zugegeben und die Suspension 30 min bei 0°C inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 90 sek bei 42°C wurden die Bakterien 1-2 min im Eisbad abgekühlt und nach Zugabe von 4 Volumen Ψ b Medium 50-70 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Platten (+Ampizillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch Kontroll-Transformation mit einer definierten Menge an Form I Plasmid DNA wurde die Transformationseffizienz bestimmt. Diese betrug bei DHI Zellen etwa $2-8 \times 10^7$ und bei DKI Zellen maximal 1×10^8 Transformanten/ μ g Form I DNA. (nach Hanahan, 1983)

3.9.3 Schnellpräparation von Plasmid-DNA

Plasmid enthaltende Bakterien wurden in einer 5 ml Übernachtkultur (LB-Medium + 50 μ g/ml Ampizillin) gezüchtet. Von dieser Kultur wurden 1.5 ml in ein Eppendorffgefäß überführt und eine Minute abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 100 μ l eiskalter gepufferter LysozymbLösung (S. 23) suspendiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 μ l eiskalte, frisch bereitete 0.2 M NaOH, 1% SDS-Lösung

zugeasetzt, die Suspension durchmischt und 5 min bei 0°C inkubiert. Dann wurde mit 150 µl eiskalter Kaliumazetatlösung pH 4.8 (S. 23) neutralisiert, das Lysat schnell durchmischt und 5 min bei 0°C inkubiert. Anschließend wurden Zelltrümmer und hochmolekulare DNA durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit gleichem Volumen an Phenol und Chloroform-Isoamylalkohol zweimal extrahiert. Die DNA wurde schließlich mit 2 Volumenteilen Ethanol gefällt, im Exsikkator getrocknet und in 50-100 µl TE pH 8.0, welches 20 µg/ml DNase-freie RNase enthielt, gelöst. Die Plasmid-DNA konnte anschließend sofort oder nach Restriktionsverdau auf Agarosegelen analysiert werden. (aus Maniatis et al., 1982; nach Birnboim and Doly, 1979)

3.9.4 Isolierung von Plasmid-DNA über Dichtegradienten-zentrifugation

Von einer Einzelkolonie wurde in 5 ml LB-Medium + 50 µg/ml Ampizillin eine Bakterien-Übernachtskultur angelegt. Von dieser Vorkultur wurde mit 1 ml eine 250 ml Hauptkultur (LB-Medium + 50 µg/ml Ampizillin) angeimpft, die 15-20 h bei 37°C geschüttelt wurde. Die Bakterien wurden dann durch Zentrifugation (10 min bei 6000 rpm/4°C) geerntet. Das Zellsediment wurde in 3.75 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 mit 26% Sucrose resuspendiert und anschließend mit 625 µl einer Lysozymlösung (20 mg/ml) für 5 min bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 625 µl 0.5 M EDTA und einer erneuten fünfminütigen Inkubation bei 4°C wurde die Suspension durch Zusetzen von 6.25 ml des Aufschlußpuffers (S. 23) langsam verdünnt. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurde die viskose Suspension homogenisiert und 2 h bei 15000 rpm/4°C zentrifugiert. Der Überstand, welcher das Plasmid enthielt, wurde vom Pellet aus Zelltrümmern und hochmolekularer DNA abdekantiert. Die Plasmid-DNA wurde durch isopyknische Zentrifugation in einem Cäsiumchlorid-Ethidiumbromid-

Dichtegradienten weiter gereinigt; hierzu wurde pro ml Überstand 1 g Cäsiumchlorid und 1 mg Ethidiumbromid beigemischt; anschließend wurde die Plasmidlösung 24 h bei 39000 rpm/20°C zentrifugiert. Die unter UV-Licht sichtbare Plasmidbande wurde mit einer Spritze seitlich entnommen und das Ethidiumbromid mit Cäsiumchlorid gesättigtem Propanol-2 mehrmals extrahiert. Anschließend wurde das Salz durch Dialyse (1 Tag gegen Dialysepuffer I, 2 Tage gegen Dialysepuffer II, S. 23) entfernt.

Die DNA wurde durch Ethanol-fällung konzentriert, in TE aufgenommen, und schließlich wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm in einem Spektralphotometer die Konzentration bestimmt (1 OD₂₆₀=50 µg DNA/ml).

(nach Vinograd et al., 1963)

3.9.6 Kolonie-Hybridisierung

Um schnell eine große Anzahl von Klonen auf rekombinante Plasmide testen zu können, wurde das Verfahren der Kolonie-Hybridisierung angewandt. Dabei wurden die erhaltenen Klone zusammen mit positiven und negativen Kontroll-Klonen auf einer "master-plate" in einem Raster angeordnet (100 Klone pro Platte). Auf die Agarplatte wurde dann ein genau passendes Nitrozellulose-Filter (BA 85, Schleicher + Schuell) aufgelegt und, nachdem es vollständig benetzt war, wieder abgezogen. Das Nitrozellulose-Filter wurde anschließend mit den Klonen nach oben auf ein mit 0.5 M NaOH getränktes Saugpapier (3MM Whatman) gelegt und für 5 min dort belassen. Danach wurde es auf einem mit 1 M Tris-HCl, pH 7.5 durchtränktem Papier 10 min neutralisiert und anschließend für 5 min auf eine Papier gelegt, das mit 1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 7.5 getränkt war. Schließlich wurde das Nitrozellulose-Filter 2 h bei 80°C gebacken und konnte danach direkt zur Hybridisierung (s. S. 35) eingesetzt werden. (Grunstein and Hogness, 1975)

3.10 Identifizierung und Charakterisierung von T-Antigenen

3.10.1 Immunperoxidase Färbung

Mit Hilfe der Immunperoxidase Färbung erfolgte der Nachweis für die Expression von T-Antigenen in transformierten Rat2- bzw. transformierten TC7 Zellen. Dazu wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS (S. 20) gewaschen und durch Behandlung mit einem Ethanol/Aceton Gemisch (1:1) für 2 min fixiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit PBS/10% FCS 4 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Maus(Anti-T)Antikörper Pab 108 (5 ug Pab 108 pro ml PBS/10% FCS) versehen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dieser Behandlung wurden die Zellen fünfmal mit PBS gewaschen und für 4 min mit PBS/10% FCS inkubiert. Als zweiter Antikörper diente ein mit Meerettich Peroxidase gekoppelter Anti-Maus Antikörper aus Kaninchen. Die Zellen wurden nun mit diesem Anti-Antikörper (1:100 verdünnt in PBS/10% FCS) 4 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurden sie fünfmal mit PBS gewaschen, mit PBS/10% FCS 1 min stehengelassen und schließlich erneut mit PBS gewaschen. Als Substrat für die Peroxidase diente 3,3'-Dimethoxybenzidin (o-Dianisidin). Eine ethanolisch gesättigte Substrat-Lösung wurde 1:100 mit PBS verdünnt und 100 ml dieser Lösung mit 7 ul 30% H₂O₂ aktiviert. Die fertige Substrat-Lösung wurde zu den Zellen gegeben und für 20 min im Dunkeln stehengelassen. Das exprimierte T-Antigen war nun durch braune Färbung im Lichtmikroskop zu erkennen.

3.10.2 Laemli-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese angewandt. Dazu wurde ein 10%iges Trenngel aus folgenden Lösungen gegossen:

16.6 ml Lösung A (30% Acrylamid, 0.8% N,N'-bis-methylacrylamid)

12.6 ml Lösung B (1.6 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.4% SDS)

19.9 ml dest. H₂O

480 ul 10% Ammoniumperoxidisulfat

24 ul N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylen-diamin (TEMED)

Darüber wurde ein 5% Sammelgel aus folgenden Lösungen gegossen:

1.65 ml Lösung A

2.50 ml Lösung B (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.4% SDS)

5.85 ml dest. H₂O

50 ul Ammoniumperoxidisulfat

10 ul TEMED

Die Proben wurden in einem Puffer aus 0.06 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% Glycerin, 2% SDS, 5% 2-Mercaptoethanol und 0.001% Bromphenolblau 5 min gekocht und auf das Gel aufgetragen. Als Marker wurde eine Proteinlösung bekannter Molekulargewichte benutzt. Für den Elektrophoresepuffer wurden 9.1 g Tris, 43.2 g Glycerin und 3.0 g SDS mit dest. H₂O auf 3 Liter aufgefüllt und der pH auf 8.3 eingestellt. Die Elektrophorese erfolgte etwa 3 h bei 40 mA. (Laemmli, 1970)

Im Anschluß daran wurde die Markerbande abgeschnitten und mit Coomassie Blau (45.4% Methanol, 9% Essigsäure und 0.05% Coomassie Brilliant Blue G 250) über Nacht angefärbt und dann mit Entfärbelösung (10% Eisessig, 40% Methanol und 50% H₂O) solange behandelt bis nur noch die Proteinbanden blau gefärbt waren. Der Rest des Gels wurde für einen "Western Blot" (S. 42) verwendet.

3.10.3 Transfer von Proteinen aus Polyacrylamid-Gelen auf Nitrozellulose

Nach der Auftrennung im Polyacrylamid-Gel wurden die Proteine in einem "Western Blot" elektrophoretisch auf Nitrozellulose-Filter übertragen. Dazu wurden das Polyacrylamid-Gel und ein entsprechend großes

Nitrozellulose-Filter in eine Blot-Apparatur eingespannt. Innerhalb von 20 h wurden die Proteine bei 30 V und 0.3 A transferiert, wobei ein Puffer aus 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 192 mM Glycin und 20% v/v Methanol verwendet wurde. (Towbin et al., 1979)

Im Anschluß daran wurden die an Nitrozellulose gebundenen Proteine mit dem Biotin-Streptavidin-System (S. 43) angefärbt.

3.10.4 Färbung von Proteinen, gebunden an Nitrozellulose, durch das Biotin-Streptavidin-System

Das Nitrozellulose-Filter wurde zunächst einmal mit PBS gewaschen und dann 1 h bei 37°C zum Absättigen der Nitrozellulose mit 3%iger BSA-Lösung in PBS inkubiert. Danach wurde fünfmal 5 min mit PBS + Tween 20 (0.1%) gewaschen. Anschließend wurde das Filter 1 h mit 30 ml PBS/1% BSA und 60 µl des monoklonalen Maus(Anti-T)Antikörpers Pab 108 (Gurney et al., 1986) bei Raumtemperatur leicht bewegt. Nach dieser Behandlung wurde das Filter wie oben gewaschen. Als zweiter Antikörper diente nun ein mit Biotin gekoppelter Anti-Maus-Antikörper aus dem Schaf. Das Filter wurde mit 30 ml PBS/1% BSA und 60 µl des Anti-Maus-Antikörpers 1 h bei Raumtemperatur leicht bewegt und anschließend wie oben gewaschen. Danach wurde das Filter 1 h mit 30 ml PBS/1% BSA und 50 µl einer den Biotin-Streptavidin-Peroxidase-Komplex enthaltenden Lösung inkubiert. Nach dieser Behandlung wurde wie oben gewaschen. Als Substrat für die Färbung wurden 25 mg Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid und 15 mg NiCl_2 in 50 ml PBS/1% BSA gelöst und 30 µl H_2O_2 hinzugefügt. Das Filter wurde nun mit dem Substrat für 20 min im Dunkeln inkubiert.

(nach Anleitung von Amersham)

Anschließend konnten T-Antigene durch dunkle Färbung identifiziert werden und eine densitometrische Mengenbestimmung der Protein-Banden durchgeführt werden. Durch den Vergleich mit Coomassie Blau gefärbten

Markerbanden bekannter Molekulargewichte konnten auch die Größen der T-Antigene bestimmt werden.

3.10.5 DNA-Bindung

Mit einem modifizierten McKay Test wurden immunpräzipitierte T-Antigene der transformierten Zellen auf ihre Fähigkeit hin geprüft, die Bindungsstellen I und II des "SV40 origins" spezifisch zu binden.

(Huber et al., 1985; Hinzpeter et al., 1986)

3.10.5.1 Präparation des Zellextrakts

Die Zellen einer konfluenten 140 mm Zellkulturplatte wurden dreimal mit isotonischem Hanks Puffer (S. 20) gewaschen, von der Platte abgeschabt und in ein Eppendorfgesäß überführt. Die Zellen wurden dann 1 min abzentrifugiert und in 500 µl Lysis-Puffer II (S. 23) resuspendiert. Die Suspension wurde 30 min bei 0°C inkubiert und schließlich 10 min zentrifugiert. Der T-Antigen haltige Überstand konnte nun für Bindungsexperimente verwendet werden.

3.10.5.2 Präparation der Staphylococcus aureus Bakterien

Die Präparation der Staphylococcus aureus Bakterien wurde von Frau U. Markau und Frl. S. Dehde nach Kessler, 1975 durchgeführt und die Bakterien in 1 ml Portionen bei -20°C aufbewahrt. Die Bakterien wurden vor der Verwendung abzentrifugiert, in 0.9 ml NETII-Puffer (S. 24) aufgenommen und 15 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurden die Bakterien fünfmal mit NETII-Puffer gewaschen und schließlich in NETII-Puffer aufgenommen und gut suspendiert.

3.10.5.3 DNA Bindung

T-Antigen haltiger Zellextrakt (100 µl) wurde unter Zugabe von 100 µl Puffer A (S. 24) mit 5 µg monoklonalem Antikörper Pab 108 und 30 µl Staphylococcus aureus Suspension immungefällt und damit von anderen zellulären Proteinen abgetrennt. (Panning et al., 1982)

Die T-Antigen Menge wurde im "Western Blot" (S. 42) bestimmt, wobei das T-Antigen durch Biotin-Streptavidin-Färbung (S. 43) sichtbar gemacht wurde. Der Immunkomplex wurde dreimal mit NETII-Puffer gewaschen, dann in 100 μ l Puffer A mit 80 mM KCl aufgenommen und 0.2 mg/ml Glycogen, sowie 1 mg/ml Rinderserumalbumin zugegeben. Nach einer halben Stunde Inkubation bei 0°C wurden 0.25 μ g geschnittene 5'endmarkierte Plasmid DNA zugegeben und für weitere 2 h inkubiert. Es handelte sich dabei um die Plasmide pSV-wt, p1097 (jeweils HindIII verdaut) und pON-wt (BcoRI, SalI verdaut). Nach erneutem Waschen mit NETII-Puffer wurde die gebundene DNA durch Zugabe von Sample-Puffer (S. 24) und Erhitzen bei 60°C vom Immunkomplex gelöst und auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Das Gel wurde nach der Elektrophorese getrocknet und eine Autoradiographie auf Kodak X-Omat S Film erstellt.

3.10.6 ATPase-Reaktion

Diese Methode ist eine Variation derer von Clark et al., (1981), und wurde von Michele Manos, Cold Spring Harbor, entwickelt. Es wird hierbei ATP durch die ATPase-Aktivität des T-Antigens in ADP und anorganisches Phosphat gespalten. Von einer konfluenten Zellkulturplatte (SV40 transformierte Zelllinie) wurde das Medium entfernt und 5 ml Puffer I (S. 24) für 5 min zugegeben. Nach Abziehen des Puffers wurden 3 ml Puffer II (S. 24) zugegeben und die Platte für 3 min stehengelassen. Auch dieser Puffer wurde wieder entfernt und anschließend vorsichtig mit Puffer I nachgewaschen, so daß nur noch Zellkerne und Zellmatrix auf der Platte zurückblieben. Nun wurden 3 ml Extraktionspuffer (Puffer III, S. 24) zugegeben, die Platte 45 min bei 4°C stehengelassen und anschließend abgeschabt. Die Suspension wurde auf zwei Eppendorfgefäße verteilt, 15 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand als T-Antigen haltiger Zellextrakt weiterverarbeitet.

Zu den Proben von 0.4 ml des Überstandes wurden nun 2 µg monoklonaler Antikörper Pab 108 zugegeben und 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl gequollene Protein-A-Sepharose (10%ige Suspension in Puffer III) zugegeben und 2.5 h bei 4°C geschüttelt. Nach Pelletieren der Sepharose wurde der Überstand entfernt und das Pellet zuerst mit Puffer IV (S. 24) und dann mit Puffer V (S. 24) gewaschen. Nach Zentrifugieren und Abnehmen des Überstandes wurden nun 100 µl ATPase-Reaktionsmischung zugegeben: Puffer V wird 0.5 µM an r-ATP gemacht und pro 100 µl 10 uCi γ - ^{32}P -ATP zugesetzt. Diese Mischung wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, zentrifugiert und 80 µl des Überstandes zu 110 µl Norit-Aktivkohle (15% Aktivkohle in 50 mM HCl, 5 mM H_2PO_4) gegeben. Nach 1-2 min wurde erneut zentrifugiert und von 80 µl des Überstandes die vorhandene Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen. Der Leerwert wurde mit T-Antigen haltigem Zellextrakt und Protein-A-Sepharose, jedoch ohne spezifische monoklonalen Antikörpern bestimmt.

4. ERGEBNISSE

4.1 Identifizierung von replikationsdefekten SV40 Genomen in transformierten Zellen

Die integrierten viralen Genome in SV40 transformierten Zellen können aktiviert werden und replizieren dann unabhängig von der chromosomalen DNA. Wiederholte Aktivierungen führen dabei zu einer Amplifikation der viralen DNA-Sequenzen, die letztlich dann aus der Zell DNA freigesetzt werden (Tooze, 1981). Solche Amplifikationen von SV40 Genomen sind aber nur möglich, wenn in einem permissiven "Zellmilieu" ein intakter SV40 Replikationsursprung durch ein replikationsaktives T-Antigen aktiviert wird. Das unbedingte Zusammenwirken dieser drei Faktoren kann nun in Zellfusionen genutzt werden, um das T-Antigen und den viralen Replikationsursprung in einer transformierten Zelle auf Replikation hin zu testen. SV40 transformierte Zellen wurden dazu durch Polyethylenglykol mit uninfizierten permissiven TC7- bzw. permissiven COS-1 Zellen fusioniert (Botchan et al., 1979; Conrad et al., 1982). COS-1 Zellen sind permissive CV-1 Zellen, die durch eine SV40 "origin"-Deletionsmutante transformiert wurden. Diese Zellen exprimieren ein replikationsaktives T-Antigen (Gluzman, 1981). Besitzen nun transformierte Zellen einen intakten SV40 Replikationsursprung, so sollte eine Fusion mit COS-1 Zellen zu einer Exzision von viralen DNA-Sequenzen führen. Besitzen diese Zellen zusätzlich ein replikations-aktives T-Antigen so ist auch nach Fusion mit TC7 Zellen eine Freisetzung viraler DNA zu erwarten (Botchan et al., 1979; Miller et al., 1984)

Die SV40 transformierten Zellen VLM, MKSA, H65-90B, THK-1t, ELONA, C0625 und C0631 (s. S. 12) wurden nun jeweils mit COS-1 bzw. TC7 Zellen fusioniert. Dazu wurden die kokultivierten Zellen mit Polyethylenglykol behandelt, gewaschen und 60-70 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde

die niedermolekulare DNA isoliert und charakterisiert. Dazu wurde die DNA in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt, dann auf Nitrozellulose transferiert und gegen ^{32}P nick-translatierte pSV-wt DNA hybridisiert.

Es zeigte sich nun, daß nach Fusion mit COS-1 Zellen in allen SV40 transformierten Zellen virale DNA-Sequenzen amplifiziert und freigesetzt werden (Abb. 5, 6). Jede transformierte Zelle besitzt somit zumindest einen intakten SV40 Replikationsursprung, der durch das T-Antigen aktiviert werden kann. Die viralen Exzisionsprodukte unterschieden sich allerdings in ihrem Bandenmuster und in ihrer Menge. So konnten aus VLM- bzw. ELONA Zellen nach Fusion mit COS-1 Zellen mindestens zehnmal mehr freie virale DNA-Sequenzen isoliert werden, als aus den anderen transformierten Zelllinien (Abb. 5, 6).

Durch Restriktionsverdau mit den Enzym BamHI, das einmal in das SV40 Genom schneidet, konnte ferner gezeigt werden, daß mehrere der SV40 Banden nur verschiedene Konformationen des selben DNA-Moleküls darstellen (Abb. 5, 6). Das Bandenmuster der freigesetzten SV40 DNA konnte in wiederholten Fusionsexperimenten sowohl qualitativ wie auch quantitativ für die meisten Zelllinien bestätigt werden. Lediglich die Chinesischen Hamsterlinien C6625 und C6631 zeigten in verschiedenen Fusionsexperimenten unterschiedlich große Exzisionsprodukte. Diese Heterogenität der amplifizierten SV40 DNA konnte allerdings auch beobachtet werden, nachdem diese Zelllinien mit chemischen Karzinogenen behandelt wurden (Lavi, 1981).

Zellfusionen zwischen den transformierten Zellen und TC7 Zellen führten dagegen in den meisten Fällen zu viel geringeren Ausbeuten an freigesetzter viraler DNA. Ferner zeigte sich auch, daß nicht in allen transformierten Zellen eine Amplifizierung von viralen Genomen möglich ist (Abb. 5).

Aus THK- bzw. ELONA Zellen konnten nach Fusion mit TC7 Zellen amplifizierte SV40 DNA-Sequenzen isoliert werden,

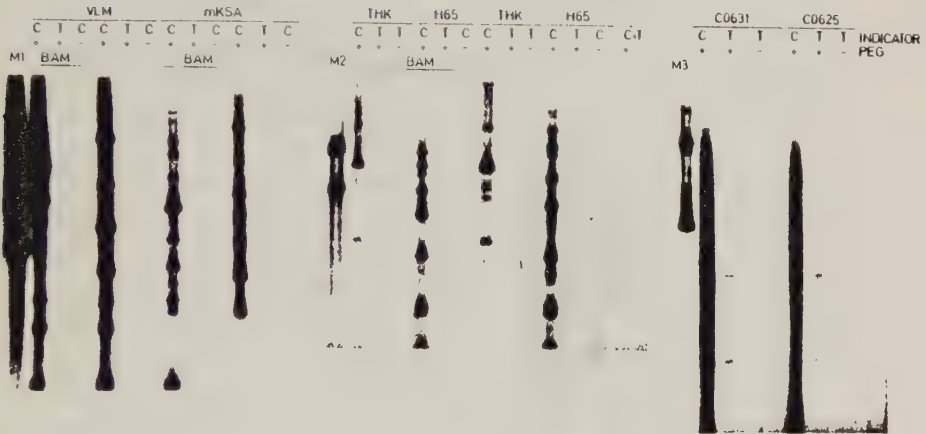


Abb. 5: Zellfusionen zwischen den SV40 transformierten Zelllinien VLM, mKSA, THK-lt, H65/90B, C0631, C0625 und TC7- bzw. COS-1 Zellen

Die SV40 transformierten Linien wurden durch PEG mit TC7- bzw. COS-1 Zellen fusioniert. Nach 72 h wurde die niedermolekulare DNA isoliert und analysiert. Dazu wurde die DNA direkt elektrophoretisiert (C0625 und C0631 Fusionen) oder zuerst mit BamHI gespalten (VLM, mKSA, THK-lt und H65/90B Fusionen) und dann auf einem 0.8% Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulose wurde die DNA schließlich mit ^{32}P nick-translatierter pSV-wt DNA hybridisiert.

(M1) entspricht 1 μg , (M2) 100 pg, (M3) 250 pg BamHI gespaltenen pSV-wt DNA (5243 und 3657 bp).

Länge der Autoradiographien: 2 h für VLM-, 20 h für alle übrigen Fusionen.

M	ELONA						ELONA		TC 7				INDICATOR PEG ENZYME
	C	C	T	T	T	T	-	-	-	-	-	-	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2			



Abb. 6: Zellfusionen zwischen der SV40 transformierten Zelllinie ELONA und TC7- bzw. COS-1 Zellen

ELONA Zellen wurden durch PEG mit TC7- bzw. COS-1 Zellen fusioniert. Nach 72 h wurde die niedermolekulare DNA aus den einzelnen Fusionen isoliert und jeweils in zwei Portionen aufgeteilt. Der eine Teil der DNA wurde mit BamHI (1), der andere Teil mit BglII (2) gespalten und anschließend auf einem 0.8% Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulose wurde die DNA mit ^{32}P nick-translatierter pSV-wt DNA hybridisiert. Als Kontrollen wurden die niedermolekularen DNAs an parallel kultivierten ELONA und TC7 Zellen bzw. aus kokultivierten ELONA und TC7 Zellen aufgeführt. (M) entspricht 100 pg BamHI gespaltenen pSV-wt DNA.

Länge der Autoradiographie: 1 h

deren Bandenmuster identisch waren mit den der viralen Exzisionsprodukte nach Fusion mit COS-1 Zellen (Abb. 5, 6). Es zeigte sich ferner, daß aus ELONA Zellen vergleichbare Mengen viraler DNA freigesetzt werden, wenn diese Zellen mit COS-1 oder TC7 Zellen fusioniert werden (Abb. 6).

Restriktionsverdauungen dieser Exzisionsprodukte mit BamHI konnten darüberhinaus zeigen, daß die einzelnen DNA-Banden nur verschiedene Konformationen eines DNA-Moleküls mit einer Größe von etwa 5.2 kb darstellen (Abb. 6).

Zellfusionen zwischen VLM-, C0625- bzw. C0631 Zellen und TC7 Zellen ließen zunächst nur diejenigen SV40 DNA-Banden erkennen, die nach Fusion mit COS-1 Zellen als Haupt-Exzisionsbanden auftraten (Abb. 5). Längere Autoradiographien ließen jedoch vermuten, daß nach Fusion mit TC7 Zellen auch diejenigen Banden zu erkennen sein würden, die nach Fusion mit COS-1 Zellen nur schwach auftraten. Zellfusionen zwischen MKSA- bzw. H65/90B Zellen und TC7 Zellen ließen dagegen selbst nach langer Autoradiographie keine Exzision viraler DNA erkennen (Abb. 5).

Kontrollversuche, in denen transformierte Zellen mit COS-1 bzw. TC7 Zellen kokultiviert, nicht aber fusioniert wurden zeigten keine Exzision von SV40 DNA. Ebenso führten Zellfusionen zwischen COS-1 und TC7 Zellen zu keiner Amplifikation von viralen DNA-Sequenzen (Abb. 5, mittleres Bild, rechte Seite).

Die Zellfusionsexperimente zeigen nun deutlich, daß diese transformierten Zelllinien SV40 Genome besitzen, die durch das T-Antigen aus COS-1 Zellen aktiviert werden können. Die meisten dieser Zellen exprimieren jedoch T-Antigene die Defekte zeigen, oder sogar völlig inaktiv sind in der Initiation der viralen DNA-Replikation. Diese Ergebnisse bestätigen und erweitern die, der Diplomarbeit von 1983. Ferner wird aber auch deutlich, daß das T-Antigen aus ELONA Zellen eine DNA-Replikationsfähigkeit besitzt, die durchaus

mit der zu vergleichen ist, die das wt T-Antigen aus COS-1 Zellen zeigt.

Weiterhin wurde nun versucht, die aus "Hirt"-Überständen isolierte niedermolekulare SV40 DNA mit der gesamten in der Zelle vorhandenen viralen DNA zu vergleichen. Damit sollte getestet werden, ob die Amplifikation der viralen DNA auch zu hochmolekularen DNA-Strukturen führt, die nicht freigesetzt werden. Dazu wurde die Zell DNA 24-, 48-, bzw. 72 h nach der Fusion aus den Zellen isoliert und mit dem Restriktionsenzym BglII, das SV40 DNA nicht schneidet, gespalten. Anschließend wurde die DNA in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, dann auf Nitrozellulose transferiert und gegen ^{32}P nick-translatierte pSV-wt DNA hybridisiert.

Es zeigten sich nun niedermolekulare SV40 DNA-Moleküle, die sehr ähnlich denen waren, die aus "Hirt"-Überständen isoliert werden konnten (Abb. 7). Diese DNA-Moleküle lagen dabei in hoher Kopienzahl bereits 24 h nach der Fusion vor, und nahmen kontinuierlich an Menge zu. Diese Daten lassen vermuten, daß in den fusionierten Zellen die viralen DNA-Sequenzen hauptsächlich als frei replizierende DNA-Moleküle vorliegen. Ein Vergleich der DNA Mengen zeigte dabei, daß nach Fusion in ELONA Zellen mindestens zehnmal mehr virale DNA-Sequenzen zu finden sind, als in fusionierten THK-1t Zellen.

4.2 Analysierung von viralen DNA-Sequenzen in SV40 transformierten Zellen

Virale DNA-Sequenzen, die in den SV40 transformierten Zellen VLM, MKSA, H65/90B und THK-1t für die T-Antigene kodieren, wurden grob charakterisiert. Dazu wurde jeweils die hochmolekulare Zell DNA isoliert und mit Restriktionsenzymen gespalten, die nicht (BglII, SstI) oder nur einmal (BamHI, EcoRI) in das SV40 Genom schneiden. Anschließend wurde die DNA in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt, dann auf Nitrozellulose transferiert und gegen ^{32}P nick-transla-

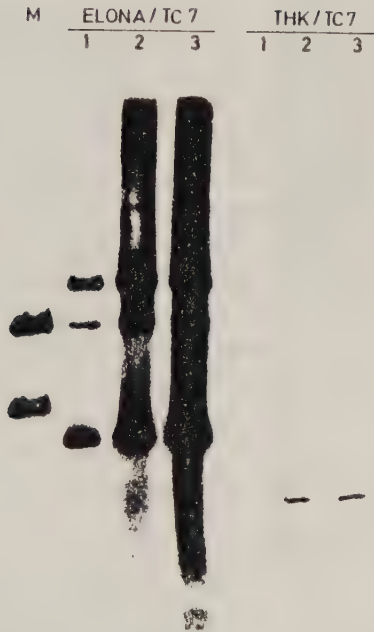


Abb. 7: Darstellung der SV40 DNA in den transformierten Linien ELONA und THK-1t nach Fusion mit TC7 Zellen

ELONA- und THK-1t Zellen wurden jeweils mit TC7 Zellen fusioniert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde jeweils die gesamte Zell DNA isoliert und analysiert. Dazu wurde jeweils 10 µg DNA mit BglII gespalten, in einem 0.7% Agarosegel aufgetrennt und durch "Southern Blot" Hybridisierung bestimmt. Als Hybridisierungsprobe wurde ^{32}P nick-translatierte pSV-wt DNA eingesetzt. (M) entspricht 50 µg BamHI gespaltenen pSV-wt DNA.

Länge der Autoradiographie: 20 h

tierte pSV-wt DNA bzw. gegen das HindIII-B-Fragment aus der frühen Region des SV40 hybridisiert.

Es zeigte sich, daß VLM DNA, die mit BglII bzw. SstI geschnitten wurde, nur ein einziges großes Fragment mit viralen DNA-Sequenzen aufweist (Abb. 8 A). Dies deutet auf eine einzige Integrationsstelle des SV40 in der Zell DNA hin. Spaltungen mit BamHI und EcoRI zeigten ferner, daß in dieser Insertion mehr als eine virale DNA Kopie vorliegen muß. Durch Hybridisierung mit dem HindIII-B-Fragment wurde dabei deutlich, daß in einem der zwei BamHI Fragmente bzw. in zwei der drei EcoRI-Fragmente T-Antigen kodierende Sequenzen vorhanden sind (Abb. 8 A, Pfeile).

Diese Daten lassen vermuten, daß die virale Insertion zumindest zwei Kopien der frühen Region aufweist. Die Struktur der viralen DNA scheint somit ähnlich komplex zu sein, wie sie für mehrere SV40 transformierte Zelllinien bereits beschrieben wurde (Clayton and Rigby, 1981; May et al., 1981).

MKSA Zellen scheinen in ihrer DNA vier getrennte Insertionen von viraler DNA zu besitzen. In zwei dieser Insertionen finden sich T-Antigen kodierende Sequenzen. Dies konnte durch die Spaltungen mit den Restriktionsenzymen BglII und SstI gezeigt werden (Abb. 8 B). Verdauungen mit EcoRI und BamHI führten ferner zu sechs bis acht Fragmenten mit viralen DNA-Sequenzen, von denen allerdings jeweils nur zwei T-Antigen kodierende Sequenzen enthalten (Abb. 8 B, Pfeile). Diese Fragmente besitzen jeweils eine ausreichende Größe um für ein T-Antigen kodieren zu können, dennoch erscheint es fraglich, ob beide frühen Regionen wirklich exprimiert werden. In Immunpräzipitationsexperimenten konnte nämlich nur eine einzige T-Antigen Hauptbande im Extrakt aus MKSA Zellen identifiziert werden (Huber et al., 1985).

THK-1t DNA, die mit SstI geschnitten wurde, zeigte zwei Banden auf, die SV40 DNA Sequenzen enthalten (Abb. 9 C). Die Spaltung mit BglII führte ebenso zu zwei Banden mit viralen DNA Sequenzen, wobei allerdings in manchen

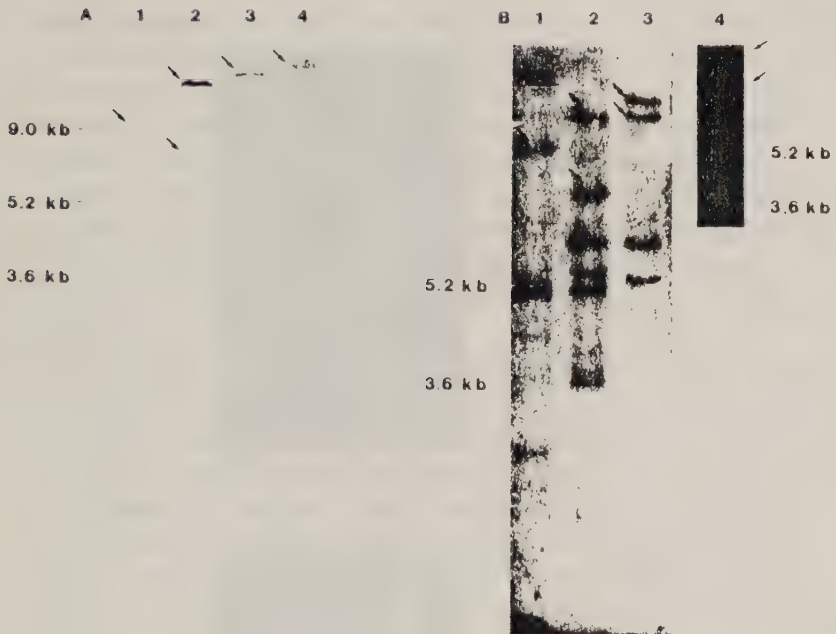


Abb. 8: Analysierung der viralen DNA-Sequenzen in den transformierten Linien VLM und MKSA

Aus den Zelllinien VLM (A) und MKSA (B) wurde die genomische DNA isoliert und jeweils 10 µg mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem 0.7% Agarosegel wurde die DNA durch "Southern Blot" Hybridisierung analysiert. Als Restriktionsenzyme wurden *Bam*HI (Spur 1), *Eco*RI (Spur 2), *Bgl*II (Spur 3) und *Sat*I (Spur 4) verwendet. Zur Identifizierung viraler DNA-Sequenzen wurde mit 32 P nick-translatierter pSV-wt DNA hybridisiert, während die frühen Regionen durch die Hybridisierung mit dem klonierten, 32 P nick-translatierten SV40 HindIII-B-Fragment bestimmt wurden (Pfeile).

Marker DNA-Fragmente bekannter Größe sind rechts oder links von den Abbildungen angedeutet.

Länge der Autoradiographie: 8 h für (A), 16 h für (B)

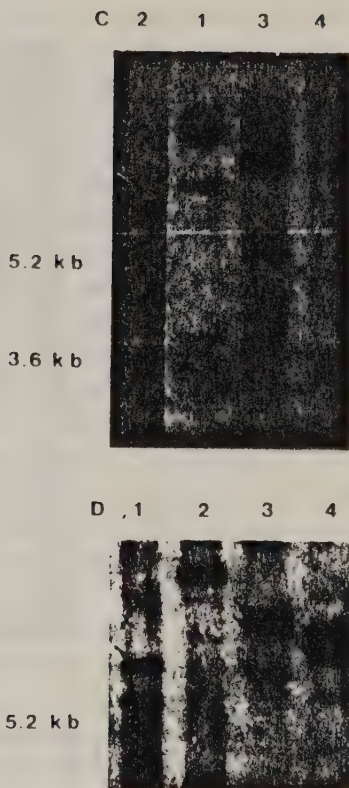


Abb. 9: Analysierung der viralen DNA-Sequenzen in den transformierten Linien THK-1t und H65/90B

Aus den Zelllinien THK-1t (C) und H65/90B (D) wurde wie beschrieben für die Abb. 8, jeweils die genomische DNA isoliert und analysiert. Als Restriktionsenzyme wurden ebenfalls *Bam*HI (Spur 1), *Eco*RI (Spur 2), *Bgl*II (Spur 3) und *Sat*I (Spur 4) verwendet. Die viralen DNA-Sequenzen wurden durch die Hybridisierung mit ^{32}P nick-translatierter pSV-wt DNA identifiziert, während die frühe Regionen durch die Hybridisierung mit dem klonierten, ^{32}P nick-translatierten SV40 *Hind*III-Fragment bestimmt wurden (Pfeile). Marker DNA-Fragmente bekannter Größe sind links von den Abbildungen angedeutet.

Länge der Autoradiographien: 24 h für (C) und (D)

Experimenten eine der beiden Banden als Doppelbande auftrat. Die Hybridisierung mit dem HindIII-B-Fragment zeigte ferner, daß nach beiden Verdauungen jeweils nur in einem Fragment T-Antigen kodierende Sequenzen vorliegen (Abb. 9 C, Pfeile). Weiterhin konnten nach Spaltungen mit BamHI und EcoRI jeweils drei Fragmente mit viralen DNA-Sequenzen identifiziert werden, von denen aber jeweils nur ein Fragment mit dem HindIII-B-Fragment hybridisierte (Abb 9 C, Pfeile). Diese Daten lassen vermuten, daß die virale Insertion nur eine Region besitzt, die für das T-Antigen kodiert.

H65/90B Zellen scheinen in ihrer DNA zwei Insertionen von viraler DNA zu besitzen. In beiden Insertionen finden sich T-Antigen kodierende Sequenzen. Dies konnte durch Spaltungen mit BglII und SstI gezeigt werden (Abb. 9 D, Pfeile). Die Spaltungen mit EcoRI führten überraschenderweise nur zu einem großen Fragment, daß mit SV40 DNA hybridisierte, dessen starke Intensität aber darauf schließen läßt, daß beide Kopien der viralen DNA in diesem Fragment enthalten sind. Nach Spaltung mit BamHI konnten dagegen drei Fragmente mit viralen DNA-Sequenzen identifiziert werden, von denen aber nur eines T-Antigen kodierende Sequenzen enthält (Abb. 9 D, Pfeile). Die Struktur der viralen DNA scheint somit ebenso komplex zu sein und könnte zwei Regionen enthalten, die für das T-Antigen kodieren.

4.3 Isolierung und Klonierung von replikationsdefekten SV40 Genomen aus transformierten Zellen

Die SV40 Genome in den transformierten Zellen VLM und H65/90B exprimieren T-Antigene, die Defekte zeigen, oder völlig inaktiv sind in der Initiation der viralen DNA-Replikation (4.1). Darüberhinaus zeigen diese T-Antigene sehr interessante biochemische Eigenschaften, wobei die T-Antigene aus den H65/90B Zellen keine ATPase-Aktivität besitzen und auch die Bindungsstelle II des SV40 "origin" nicht mehr binden können (s. 1.5). Die T-Antigene aus den

VLM Zellen zeigen dagegen eine wt ähnliche DNA-Bindung, besitzen eine ATPase-Aktivität und können ebenfalls ATP binden (s. 1.5). Diese T-Antigene lassen möglicherweise eine weitere biochemische Eigenschaft erkennen, die wichtig ist für die DNA-Replikation.

Die viralen Genome der Zelllinien VLM bzw. H65/90B sollten nun isoliert, kloniert und charakterisiert werden.

Für die Isolierung der viralen Genome wurden die transformierten Zellen VLM bzw. H65/90B zunächst mit COS-1 Zellen fusioniert. Die hiermit initiierte Amplifikation der viralen DNA-Sequenzen ermöglichte es, aus "Hirt"-Überständen angereicherte SV40 Genome zu isolieren. Diese niedermolekulare DNA wurde dann über einen Caesiumchlorid-Ethidiumbromid-Dichtegradienten gereinigt, in dem eine Abtrennung der zirkulären DNA Moleküle von der hochmolekularen linearisierten Zell DNA erfolgte. Die zirkulären DNA Moleküle wurden anschließend mit BamHI, einem Restriktionsenzym, das die SV40 DNA einmal schneidet, gespalten und in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Identifizierung der Fragmente, die SV40 DNA-Sequenzen enthalten, wurde ferner ein Aliquot der gespaltenen DNA getrennt auf dem Agarosegel aufgetragen, dann auf Nitrozellulose transferiert und gegen ^{32}P nick-translatierte pSV-wt DNA hybridisiert.

Somit konnten in der niedermolekularen DNA aus fusionierten VLM Zellen zwei-, und aus fusionierten H65/90B Zellen drei Hauptbanden identifiziert werden, die sehr ähnlich denen waren, die in Abb. 5 als Haupt-Exzisionsbanden auftraten (Daten nicht gezeigt). Diese fünf Fragmente wurden nun aus dem Agarosegel isoliert und getrennt in die BamHI-Stelle des Vektors pBR322 ligiert. Mit diesen hybriden DNA Molekülen wurden anschließend die E. coli Stämme DH1 bzw. DK1 transformiert. Ampizillin resistente Kolonien wurden schließlich durch in situ Hybridisierung mit ^{32}P nick-

translatierter SV40 wt DNA "gescreened", und es zeigte sich im Falle der Klonierung von VLM-Exzisionsprodukten, daß etwa 30-40% der Klone virale DNA-Sequenzen besitzen. Dagegen führte die Klonierung von H65/90B-Exzisionsprodukten lediglich zu 10-15% positiven Klonen.

4.4 Restriktionsanalyse der klonierten SV40 Genome

Die Klonierung der amplifizierten SV40 DNA-Sequenzen aus den transformierten Zellen VLM und H65/90B führten zu fünf verschiedenen Klon-Familien. Es handelt sich dabei um zwei Gruppen von Klonen, die virale DNA-Sequenzen aus VLM Zellen besitzen, und um drei Gruppen mit viralen Exzisionsprodukten aus H65/90B Zellen. Zur Charakterisierung wurde nun jeweils ein Klon aus jeder Familie herausgezogen. Es handelt sich dabei um die Klone pSV VLM 4, 8 bzw. pSV H65 12, 17, 34. Zur Kartierung der klonierten SV40 DNA-Sequenzen wurden Restriktionsenzyme verwendet, durch die es möglich ist festzustellen, ob und in welcher Form die einzelnen funktionellen Bereiche des SV40 Genoms vorhanden sind. Dabei interessierte besonders die Struktur der T-Antigen kodierenden Region und des SV40 Kontrollbereiches. Als Vergleich wurden in sämtlichen Restriktionsverdauungen entweder pSV-wt oder pEP DNA verwendet. Die Plasmid DNA aus den einzelnen Klonen wurde über Dichtegradienten-zentrifugation isoliert und dann mit den entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten. Anschließend wurde die DNA in 0.8 % - 2 % Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Spaltung der DNA aus den einzelnen Klonen mit dem Enzym BamHI führte jeweils zu dem linearen pBR322 Vektor-Fragment (4.3 kb) und zu den entsprechenden Insert-Fragmenten. Es handelt sich dabei um ein 5.5 kb bzw. 7.5 kb großes Insert-Fragment bei den Klonen pSV VLM 4, 8 (Abb. 10, Spuren 2, 1) und um ein 3 kb, 3.6 kb bzw. 4.5 kb großes Fragment bei den Klonen pSV H65 34, 17, 12 (Abb. 10, Spuren 4, 5, 6). Durch die Spaltung mit BglII, einem Enzym, das die SV40 DNA einmal

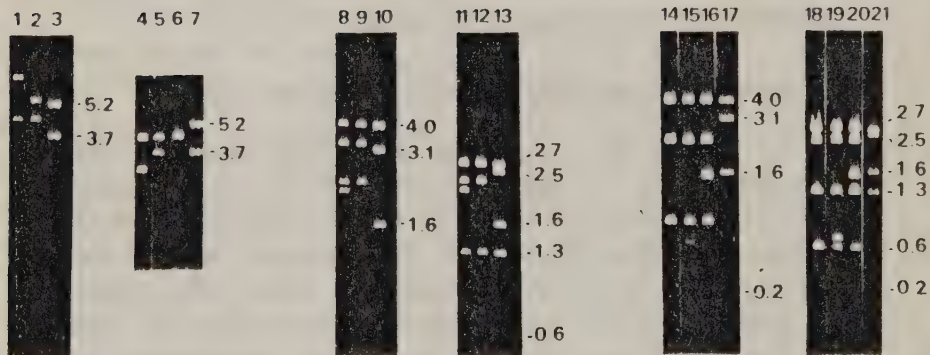


Abb. 10: Restriktionsanalyse der Klone pSV VLM 4, 8 und pSV H65 12, 17, 34 (1)

Die Plasmid DNA der Klone pSV VLM 4, 8 und pSV H65 12, 17, 34 wurde über Dichtegradientenzentrifugation isoliert, mit Restriktionsenzymen gespalten und in 0.8%-2% Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Spaltung der DNA wurden die Enzyme BamHI, BglI und die Kombination BamHI/BglI verwendet. Als Marker DNA wurde jeweils pSV-wt DNA eingesetzt.

+ BamHI

- 1 = pSV VLM 8
2 = pSV VLM 4
3 = pSV-wt
(5.2-, 3.7 kb)

+ BamHI

- 4 = pSV H65 34
5 = pSV H65 17
6 = pSV H65 12
7 = pSV-wt

+ BglI

- 8 = pSV VLM 8
9 = pSV VLM 4
10 = pSV-wt
(4.0-, 3.1-,
1.6-, 0.2 kb)

+ BamHI/BglI

- 11 = pSV VLM 8
12 = pSV VLM 4
13 = pSV-wt
(2.7-, 2.5-,
1.6-, 1.3-,
0.6-, 0.2 kb)

+ BglI

- 14 = pSV H65 34
15 = pSV H65 17
16 = pSV H65 12
17 = pSV-wt

+ BamHI/BglI

- 18 = pSV H65 34
19 = pSV H65 17
20 = pSV H65 12
21 = pSV-wt

bei Nukleotid (5235) und die Plasmid DNA dreimal schneidet, zeigten sich für die Klone pSV VLM 4 (Abb. 10, Spur 9) und pSV H65 34 (Abb. 10, Spur 14) entsprechend vier Fragmente, während für die Klone pSV VLM 8 (Abb. 10, Spur 8) und pSV H65 12, 17 (Abb. 10, Spuren 16, 15) fünf Fragmente zu erkennen sind. Durch den Vergleich mit der BglI gespaltenen pSV-wt DNA konnte dabei gezeigt werden, daß jeweils zwei Fragmente (0.2 kb bzw. 2.3 kb) in den einzelnen Klonen reine pBR322 DNA-Sequenzen tragen. Darüberhinaus wurde deutlich, daß in der klonierten SV40 wt DNA und in den DNAs der einzelnen Klone jeweils ein 4.0 kb großes Fragment vorhanden ist. Dieses Fragment aus der pSV-wt DNA besitzt dabei pBR322 DNA-Sequenzen sowie die vollständige frühe Region des SV40. Durch die Doppelverdauung der pSV-wt DNA mit BglI/BamHI (Abb. 10, Spuren 13, 21) konnte ferner die frühe Region des SV40 in einem 2.7 kb großen Fragment von der Plasmid DNA abgetrennt werden. Dieses Fragment (2.7 kb) konnte ebenso in den DNAs der einzelnen Klone identifiziert werden (Abb. 10, Spuren 11, 12, 18, 19, 20). Dies weist daraufhin, daß in den Klonen pSV VLM 4, 8 und pSV H65 12, 17, 34 jeweils die frühe Region des SV40 vollständig vorliegt und weder größere Duplikationen noch andere Rearrangements besitzt, wie sie sonst oftmals in viralen Genomen von transformierten Zellen beobachtet wurden (Clayton and Rigby, 1981).

Die Spaltung der pSV-wt DNA mit BglI zeigte ferner ein 3.1 kb großes Fragment auf, das pBR322 DNA-Sequenzen sowie die späte Region des SV40 besitzt (Abb. 10, Spuren 10, 17). Ein Fragment dieser Größe konnte in den DNAs der einzelnen Klone nicht identifiziert werden. Dagegen fanden sich in den Klonen pSV VLM 4, 8 jeweils ein 3.4 kb großes Fragment (Abb. 10, Spuren 9, 8) und in den Klonen pSV H65 12, 17, 34 jeweils ein 0.9 kb großes Fragment (Abb. 10, Spuren 16, 15, 14). Diese Fragmente konnten mit BamHI nachgeschnitten werden, wodurch gezeigt wurde, daß auch hier Plasmid DNA-Sequenzen vorliegen müssen. Zusätzlich zu diesen Fragmenten zeigte der Klon pSV VLM 8 ein 2 kb (Abb. 10,

Spuren 8, 11), der Klon pSV H65 12 ein 1.5 kb (Abb. 10, Spuren 16, 20) und der Klon pSV H65 17 ein 0.6 kb großes Fragment (Abb. 10, Spuren 15, 19), in denen keine pBR322 DNA-Sequenzen vorhanden sind.

Durch die Spaltung mit PstI, einem Enzym, das die SV40 DNA zweimal und die Plasmid DNA einmal schneidet, zeigten sich für die Klone pSV VLM 4, 8 entsprechend drei Fragmente (Abb. 11, Spuren 2, 1), während für die Klone pSV H65 12, 17, 34 nur zwei Fragmente (Abb. 11, Spuren 6, 5, 4) zu erkennen sind. Durch den Vergleich mit der PstI gespaltenen pSV-wt DNA (Abb. 11, Spuren 3, 7) konnte ferner gezeigt werden, daß in der klonierten SV40 wt DNA und in den DNAs der einzelnen Klone jeweils ein 1.8 kb großes Fragment vorhanden ist. Dieses Fragment aus der pSV-wt DNA besitzt neben Plasmid DNA-Sequenzen auch 671 bp aus dem 3'-terminalen Bereich der frühen Region. Durch Doppelverdauung PstI/BamHI konnte dieses Fragment (671 bp) in der klonierten SV40 wt DNA und in den DNAs der einzelnen Klone identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Ebenso konnte durch die Doppelverdauung gezeigt werden, daß auch das 4.2 kb große Fragment der Klone pSV VLM 4, 8 Plasmid DNA-Sequenzen besitzt. Dagegen weisen das 3.8 kb und das 5.8 kb große Fragment der Klone pSV VLM 4, 8 keine pBR322 DNA-Sequenzen auf (Daten nicht gezeigt).

Durch die Spaltung mit RcoRI, einem Enzym, das die SV40 DNA und die Plasmid DNA jeweils einmal schneidet, zeigten sich für den Klon pSV VLM 4 drei und für den Klon pSV VLM 8 vier Fragmente (Abb. 11, Spuren 9, 8). Dagegen wiesen die Klone pSV H65 12, 17, 34 jeweils nur ein Fragment auf (Abb. 11, Spuren 13, 12, 11), wodurch nachgewiesen wird, daß in den Insert-Fragmenten dieser Klone keine Schnittstellen für RcoRI vorhanden sind.

Der Klon pSV VLM 8 weist drei Fragmente (5.2 kb, 3.5 kb und 1.0 kb) auf, die ebenso im Klon pSV VLM 4 vorhanden sind

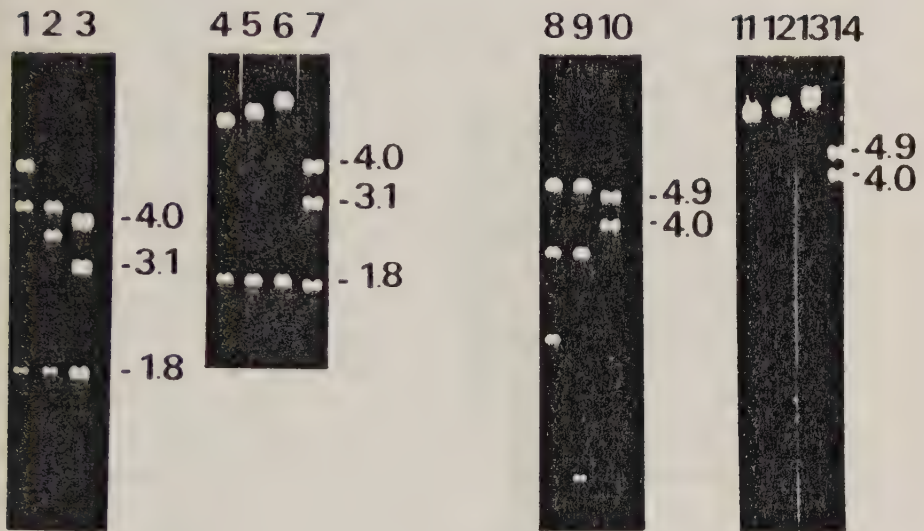


Abb. 11: Restriktionsanalyse der Klone pSV VLM 4, 8
und pSV H65 12, 17, 34

Die Plasmid DNA der einzelnen Klone wurde wie für die Abb. 10 beschrieben, isoliert und in einem 0.8 % Agarosegel analysiert. Zur Spaltung der DNA wurde jedoch die Enzyme *Pst*I und *Eco*RI verwendet.

Als Marker DNA wurde jeweils pSV-wt DNA eingesetzt.

+ *Pst*I

- 1 = pSV VLM 8
- 2 = pSV VLM 4
- 3 = pSV-wt
(4.0-, 3.1-, 1.8 kb)

+ *Pst*I

- 4 = pSV H65 34
- 5 = pSV H65 17
- 6 = pSV H65 12
- 7 = pSV-wt

+ *Eco*RI

- 8 = pSV VLM 8
- 9 = pSV VLM 4
- 10 = pSV-wt
(4.9-, 4.0 kb)

+ *Eco*RI

- 11 = pSV H65 34
- 12 = pSV H65 17
- 13 = pSV H65 12
- 14 = pSV-wt

(Abb. 11, Spuren 9, 8). Zusätzlich findet sich im Klon pSV VLM 8 ein Fragment mit der Größe von 2.0 kb (Abb. 11, Spur 8). Durch die Doppelverdauung mit EcoRI/BamHI konnte gezeigt werden, daß sowohl das 5.3 kb wie auch das 3.5 kb große Fragment Plasmid DNA-Sequenzen enthalten (Daten nicht gezeigt). Durch die Hybridisierung mit ^{32}P nick-translatierter pSV-wt DNA wurde ferner nachgewiesen, daß das 1.0 kb große Fragment keine viralen DNA-Sequenzen besitzt (Abb. 12). Dieses Fragment wurde nun in pUC9 subkloniert und als Probe zur Hybridisierung von zellulären DNA aus VLM Zellen verwendet. Es konnte dabei nachgewiesen werden, daß dieses Fragment tatsächlich aus der VLM Zell DNA stammt (Abb. 13, Spuren 2, 3, 4). Ferner wurde deutlich, daß dieses Fragment nicht durch Ligierung eines linearen Exzisionsproduktes entstand, sondern als ganzes Fragment bereits in der Zell DNA vorlag. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß dieses Fragment innerhalb der BglII und SstI-Fragmente der Zell DNA lokalisiert ist, in denen der Integrationsort des SV40 vorliegt (Abb. 13, Spuren 3, 4).

Durch die Spaltung mit HindIII, einem Enzym, das die Plasmid DNA einmal und die SV40 DNA sechsmal schneidet, zeigten sich für die Klone pSV VLM 4 (Abb. 14, Spur 2) und pSV H65 12, 17 (Abb. 14, Spuren 7, 8) jeweils fünf Fragmente. Für die Klone pSV VLM 8 (Abb. 14, Spur 3) und pSV H65 34 (Abb. 14, Spur 9) konnten dagegen sechs bzw. vier Fragmente identifiziert werden. Durch den Vergleich mit HindIII gespaltener pSV-wt DNA (Abb. 14, Spuren 1, 6) wurde dabei deutlich, daß jeder Klon das B- und das D-Fragment (1169 bp, 526 bp), nicht aber das E- und das F-Fragment (447 bp, 215 bp) des SV40 besitzt. Durch Hybridisierung mit ^{32}P nick-translatierter pEP DNA (kloniertes HindIII-C-Fragment des SV40) wurde deutlich, daß SV40 "origin" DNA-Sequenzen in den Klonen pSV VLM 4, 8 (Abb. 14, Spuren 4, 5) jeweils in einem 1.9 kb großen Fragment vorliegen. Zusätzlich besitzt der Klon pSV VLM 8 ein 0.9 kb großes Fragment, das ebenso solche DNA-Sequenzen trägt (Abb. 14, Spur 5). Durch Doppelverdauung mit HindIII/EcoRI konnte



Abb. 12: Nachweis des EcoRI-Fragments (1.0 kb) aus dem Klon pSV VLM 8 als nicht virales DNA-Fragment

Die Plasmid-DNA des Klons pSV VLM 8 wurde mit Restriktionsenzymen verdaut, in einem 2% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und durch "Southern Blot" Hybridisierung analysiert. Zur Spaltung der DNA wurden die Enzyme BglI (Spur 1), HindIII (Spur 2), EcoRI (Spur 3; 6.3-, 3.5-, 2.0 kb) und BamHI (Spur 4) verwendet. Zur Identifizierung viraler DNA Fragmente wurde mit ^{32}P nick-translatierter SV40 wt DNA hybridisiert. Länge der Autoradiographie: 20 h

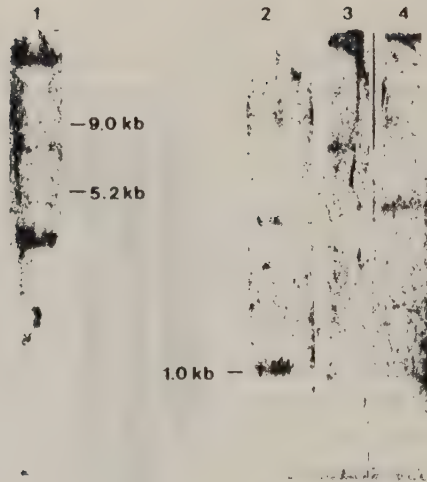


Abb. 13: Nachweis des EcoRI-Fragments (1.0 kb) in der Zell DNA der transformierten Zelllinie VLM

Aus der Zelllinie VLM wurde die genomische DNA isoliert und jeweils 10 µg mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem 0.7% Agarosegel wurde die DNA durch "Southern Blot" Hybridisierung analysiert. Als Restriktionsenzyme wurden EcoRI (Spur 1 und 2), BglI (Spur 3) und SstI (Spur 4) verwendet. Zur Identifizierung von DNA-Sequenzen des EcoRI-Fragments wurde mit dem klonierten, ^{32}P nick-translatierten EcoRI-Fragment hybridisiert (Spuren 2, 3 und 4). Zur Bestimmung viraler DNA-Sequenzen wurde mit ^{32}P nick-translatierter pSV-wt DNA hybridisiert (Spuren 1, 3 und 4). Pfeile in den Spuren 3 und 4 zeigen Banden, die mit beiden DNA-Proben hybridisieren. Als Größenmarker sind links und rechts von den Abbildungen DNA-Fragmente bekannter Größe angedeutet.

Länge der Autoradiographie: 36 h

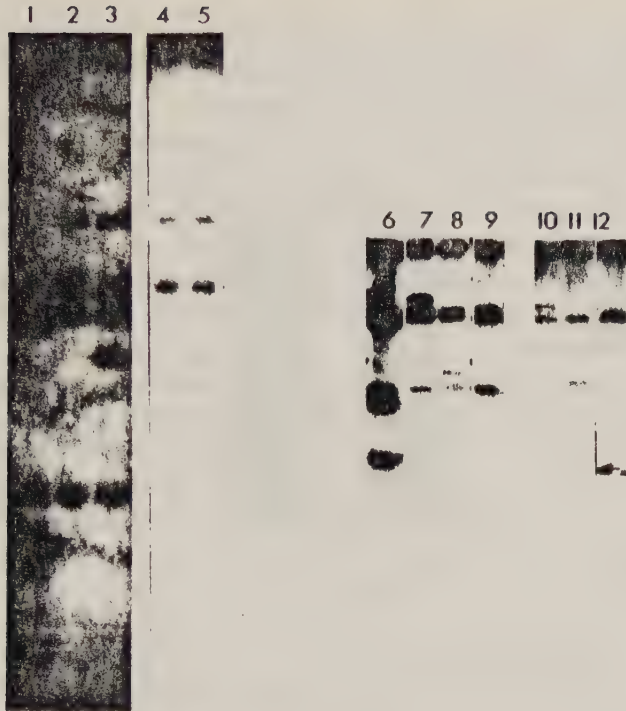


Abb. 14: Restriktionsanalysen der Klone pSV VLM 4, 8 und pSV H65 12, 17, 34 (3)

Die Plasmid DNA der einzelnen Klone wurde mit HindIII gespalten, in einem 2% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und durch "Southern Blot" Hybridisierung analysiert. Zur Identifizierung der pBR bzw. viralen DNA-Sequenzen wurde mit ^{32}P nick-translatierter pSV-wt DNA hybridisiert (Spuren 1, 2, 3, 6, 7, 8 und 9). Die Fragmente mit SV40 "origin" DNA-Sequenzen wurden dagegen durch Hybridisierung mit ^{32}P nick-translatierter pEP DNA bestimmt (Spuren 4, 5, 10, 11 und 12). Als Marker DNA wurde pSV-wt DNA eingesetzt.

Länge der Autoradiographie: 14 h

- | | |
|--------------------|--------------------|
| 1, 6 = pSV-wt | 7, 10 = pSV H65 12 |
| (4.2-, 1.3-, 1.2-, | 8, 11 = pSV H65 17 |
| 1.1-, 0.5-, 0.4-, | 9, 11 = pSV H65 34 |
| 0.2 kb) | |
| 2, 4 = pSV VLM 4 | |
| 3, 5 = pSV VLM 8 | |

ferner gezeigt werden, daß innerhalb des 1.9 kb großen Fragments auch das zelluläre EcoRI Fragment (1.0 kb) lokalisiert ist (Daten nicht gezeigt).

In den Klonen pSV H65 12, 17, 34 liegen die SV40 "origin" DNA-Sequenzen jeweils in einem 1.3 kb großen Fragment (Abb. 14, Spuren 10, 11, 12). Darüberhinaus finden sich auch in einem 1.5 kb großen Fragment des Klon pSV H65 12 (Abb. 14, Spur 10) und in einem 0.6 kb großen Fragment des Klon pSV H65 17 (Abb. 14, Spur 11) DNA-Sequenzen, die mit pEP DNA hybridisieren.

Weiterhin wurde versucht, die SV40 Kontrollbereiche dieser Klone durch die Doppelverdauung mit BglII/KpnI genauer zu charakterisieren. PSV-wt DNA, die mit diesen Enzymen geschnitten wurde, zeigte ein 302 bp großes Fragment, das den vollständigen SV40 Kontrollbereich ("origin", Promotor, Enhancer) trägt (Abb. 15, Spuren 6, 14). Es zeigte sich nun, daß in den Klonen pSV H65 12, 17, 34 jeweils ein Fragment mit einer Größe von etwa 300 bp vorliegt (Abb. 15, Spuren 13, 12, 11), während die Klone pSV VLM 4, 8 jeweils ein 1.9 kb großes Fragment besitzen (Abb. 15, Spuren 5, 4). Dies ist erklärbar, da das zelluläre EcoRI-Fragment (1.0 kb) innerhalb eines DNA-Abschnitts lokalisiert ist, der SV40 "origin" DNA-Sequenzen besitzt.

Durch die Spaltung mit SphI, einem Enzym, das je einmal in die zwei 72 bp "repeats" des SV40 Enhancer (bp 128, bp 200) schneidet, wurde ferner versucht festzustellen, ob der virale Enhancer vorhanden ist. Es zeigte sich, daß in jedem Klon das 0.07 kb große Fragment, welches auf die beiden Schnittstellen des SphI Enzyms hindeuten würde, fehlt (Abb. 15, Spuren 15-19). Da allerdings in jedem Klon nach einer Doppelverdauung mit HindIII/SphI ein 200 bp großes Fragment erkennbar war (Daten nicht gezeigt), wurde deutlich, daß jeder Klon die Schnittstelle bp 128 für SphI besitzt, daß aber die Schnittstelle bp 200 jeweils fehlt.

Von den Klonen pSV VLM 4, 8 wurden nun das 0.2 kb große

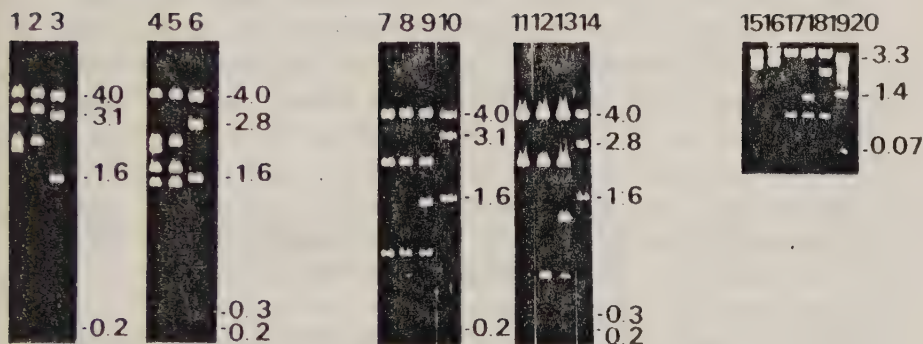


Abb. 15: Restriktionsanalyse der Klone pSV VLM 4, 8 und pSV H65 12, 17, 34 (4)

Die Plasmid DNA der Klone pSV VLM 4, 8 und pSV H65 12, 17, 34 wurde mit Restriktionsenzymen gespalten und in 0.8% bzw. 2% Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Spaltung der DNA wurden die Enzyme BglI, BglI/KpnI und SphI verwendet. Als Marker DNA wurde pSV-wt bzw. pBP DNA eingesetzt.

+ BglI
1 = pSV VLM 8
2 = pSV VLM 4
3 = pSV-wt
(4.0-, 3.1-,
1.6-, 0.2 kb)

+ BglI/KpnI
4 = pSV VLM 8
5 = pSV VLM 4
6 = pSV-wt
(4.0-, 2.8-,
1.6-, 0.3-,
0.2 kb)

+ BglI
7 = pSV H65 34
8 = pSV H65 17
9 = pSV H65 12
10 = pSV-wt

+ BglI/KpnI
11 = pSV H65 34
12 = pSV H65 17
13 = pSV H65 34
14 = pSV-wt

+ SphI
15 = pSV VLM 8
16 = pSV VLM 4

+ SphI
17 = pSV H65 34
18 = pSV H65 17
19 = pSV H65 12
20 = pBP
(3.3-, 1.4-,
0.07 kb)

HindIII/SphI- (pH-S VLM 4, 8) und das 0.18 kb große SphI/EcoRI-Fragment (pS-E VLM 4) in pAT153 subkloniert und durch die Dideoxymethode sequenziert (Abb. 16, 17). Ebenso wurde aus dem Klon pSV H65 34 das HindIII/SphI-Fragment (pH-S H65 34) subkloniert und sequenziert (Abb. 16). Es zeigte sich, daß im Vergleich zur SV40 wt DNA (Stamm 776; pH-S wt) das HindIII/SphI-Fragment aus den Klonen pSV VLM 4, 8 zwei Punktmutationen aufweist. Es handelt sich um eine Transition (C T) an der Stelle 5209 und um eine Deletion (A) an der Position 81. Die Transition liegt dabei auf der späten Seite der T-Antigen Bindungsstelle I, während die Deletion im Bereich der drei 21 bp "repeats" des Promotors lokalisiert ist. Ferner zeigte sich, daß im "origin"-proximalen Bereich des Enhancer (bp 107-128) keine Nukleotidänderungen im Vergleich zur SV40 wt DNA vorliegen. Das sequenzierte HindIII/SphI-Fragment des Klons pSV H65 34 ergab im Vergleich zur SV40 wt DNA eine einzige Veränderung, bei der es sich allerdings auch um die Transition (C T) an der Stelle 5209 handelt.

Die Sequenzierung des SphI/EcoRI-Fragments (bp 128-304) aus den Klonen pSV VLM 4, 8 zeigte, daß im Bereich des ersten 72 bp "repeat" (bp 128-179) zwei Punktmutationen im Vergleich zum SV40 wt Enhancer auftreten. Es handelt sich um die Transitionen (G A) an der Stelle 145 und (A G) an der Position 179. Ferner wird deutlich, daß das zweite 72 bp "repeat" deletiert ist. In den Nukleotidbereichen 179-195 des SphI/EcoRI-Fragments finden sich virale DNA-Sequenzen, die aber aus dem Bereich 251-267 der SV40 wt DNA stammen. Schließlich zeigt der Bereich 196-304 nur noch DNA-Sequenzen auf, die keine Homologien zur SV40 DNA aufweisen.

Auf Grund all dieser Daten konnten die Restriktionskarten für die Klone pSV VLM 4, 8 und pSV H65 12, 17, 34 aufgestellt werden (Abb. 18).

**Abb. 16: DNA-Sequenzen des subklonierten "origin"-
Fragments HindIII/SphI aus den Klonen pH-S wt,
pH-S VLM 4, 8 bzw. pH-S H65 34**

Die DNA der einzelnen Klone wurde jeweils durch die Dichte-
gradientenzentrifugationsmethode isoliert. Die Sequenzierung
wurde wie beschrieben (s. 3.8.6) durch die Dideoxymethode
(Wallace et al., 1981; Chen and Seeburg, 1985) durchgeführt,
wobei ein RcoRI-Primer (New England Biolabs) verwendet
wurde. Am rechten Bildrand sind jeweils die Sequenz-
unterschiede in den DNAs der Klone pH-S wt, pH-S VLM 4, 8
bzw. pH-S H65 34 gekennzeichnet. -s. nächste Seite

pH-Swt

A C G T

pH-S VLM 4,8

A C G T A C G T

pH-SH65 34

A C G T

-Δ A 81

A
C
T
C 5209
C
T
C

A
C
T
T 5209
C
T
C

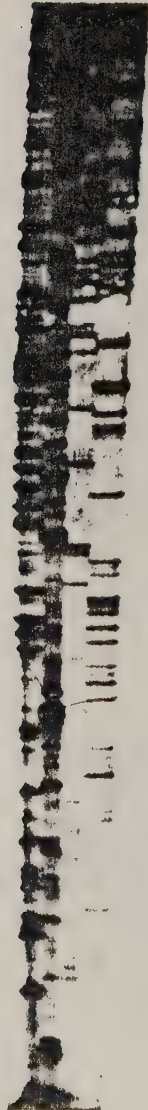
A
C
T
T 5209
C
T
C

**Abb. 17: DNA-Sequenz des subklonierten "origin"-Fragments
SphI/EcoRI aus dem Klon pS-E VLM 4**

Entsprechend der Beschreibung für die Abb. 16 wurde die DNA des Klon pS-E VLM 4 isoliert und sequenziert. Am rechten Bildrand sind die Sequenzunterschiede 145 (G A) bzw. 179 (A G) zur SV40 wt DNA (Stamm 776) gekennzeichnet. Ferner ist das SV40 wt Fragment (251-267) markiert, das im Bereich 179-195 des SphI/EcoRI-Fragments aus dem Klon pS-E VLM 4 vorliegt.

pS-E VLM 4

A C G T



-G→A 145

A→G 179

251-267 SV40wt
195

**Abb. 18: Restriktionskarten der Klone pSV VLM 4, 8
und pSV H65 12, 17, 34**

Die Klone pSV VLM 4 (+ 5.5 kb Insert), 8 (+ 7.5 kb Insert) und pSV H65 12 (+ 4.5 kb), 17 (+ 3.6 kb), 34 (+ 3.0 kb) wurden jeweils mit den Restriktionsenzymen BamHI (B1), BglI (B), BamHI/BglI, PstI (P), EcoRI (E), HindIII (H), BglI/KpnI, SphI (S) gespalten. Als Marker DNAs wurden pSV-wt (+ 5.2 kb Insert) und pBP (+ 1.1 kb Insert) mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten. Sämtliche Klone zeigen jeweils in der frühen Region des SV40 ein Restriktionsmuster, das identisch ist mit dem, der pSV-wt DNA. Ferner ist in allen Klonen die späte Region des SV40 deletiert. Die Klone pSV VLM 4 und pSV H65 34 zeigen jeweils einen Bereich, der virale "origin" DNA-Sequenzen besitzt, während in den Klonen pSV VLM 8 und pSV H65 12, 17 jeweils zwei SV40 "origin"-Bereiche lokalisiert sind. Sämtliche Klone besitzen in ihren viralen "origin"-Bereichen nur eine SphI-Schnittstelle (bp 128), und zumindest in den Klonen pSV VLM 4 ist das zweite 72 bp "repeat" des Enhancer jeweils durch zelluläre DNA-Sequenzen ersetzt. In den Klonen pSV H65 12, 17, 34 sind diese Enhancer Bereiche vermutlich auch durch zelluläre DNA-Sequenzen ersetzt. Ferner liegen in den Klonen pSV VLM 8 und pSV H65 12, 17, 34 zwischen den einzelnen "origin"-Bereichen DNA-Sequenzen vor, die vermutlich ebenso zellulärer Art sind.

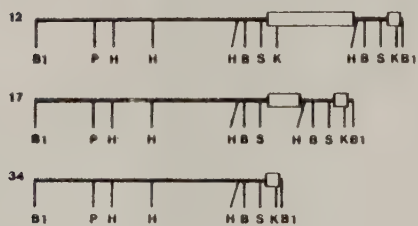
Symbolik:

- — virale DNA
- — zelluläre DNA (durch Sequenzierung und Hybridisierung gezeigt)
- — vermutlich zelluläre DNA (keine Hybridisierungsdaten)

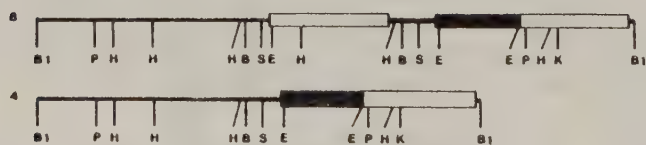
SV40-wt



pSV-H66



pSV-VLM



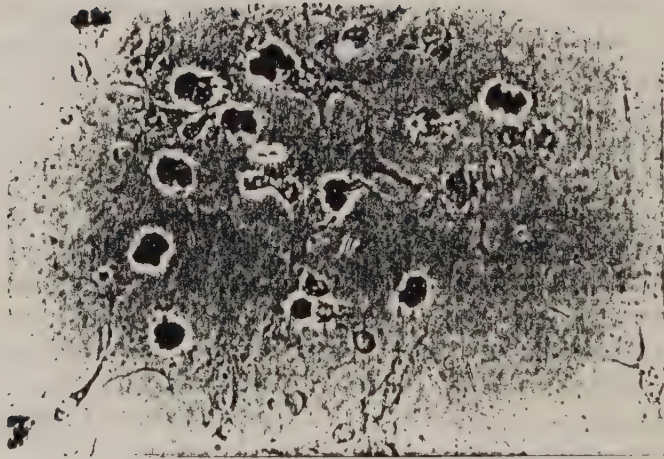
4.5 Expression der T-Antigene von klonierten SV40 Genomen

Die Charakterisierung der Klone pSV VLM 4, 8 und pSV H65 12, 17, 34 umfaßte neben der Aufklärung ihrer DNA-Strukturen auch den Nachweis ihrer biologischen Aktivität. Die Frage nach der Expression der T-Antigene, die von diesen Klonen kodiert werden, wurde dabei als erstes angegangen.

Dazu wurden jeweils 5 µg DNA der einzelnen Klone sowie 5 µg pSV-wt DNA durch die DEAE-Dextran Methode in TC7 Zellen transfiziert. Die Zellen wurden dann bei 37°C inkubiert und 48 h nach Transfektion fixiert. Die Expression der T-Antigene in diesen Zellen wurde nun durch Immunperoxidase-Färbung getestet. Es zeigte sich, daß die T-Antigene sämtlicher Klone in TC7 Zellen exprimiert werden (Abb. 19). Durch den Vergleich mit Zellen, die durch die pSV-wt DNA transfiziert wurden (Abb. 20), wurde ferner deutlich, daß die T-Antigenexpression von diesen Klonen sowohl qualitativ wie auch quantitativ vergleichbar ist mit der Expression des wt T-Antigens. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß die T-Antigene von diesen Klonen ausschließlich im Zellkern und nicht im Zytoplasma lokalisiert sind.

4.6 Transformation von Rattenfibroblastenzellen (Rat2)

Die Transformation von Zellen, die für SV40 nicht- bzw. semi-permissiv sind, ist eine wichtige biologische Funktion des T-Antigens. Die T-Antigene der Klone pSV VLM 4, 8 und pSV H65 12, 17, 34 wurden daher auf ihre Fähigkeit hin getestet, Rattenfibroblastenzellen (Rat2) zu transformieren. Dazu wurden jeweils 5 µg DNA der einzelnen Klone sowie 5 µg pSV-wt DNA durch die Kalziumphosphat-Kopräzipitationsmethode in Rat2 Zellen transfiziert und die Zellen dann bei 37°C inkubiert. Nach 12-15 Tagen wurden jeweils die Zellen einer Platte mit Giemsa-Lösung angefärbt. Transformierte Zellen können dichter und mehrschichtig wachsen, und sind daher als dunkle Zellhaufen (Foci) gut von nicht transformierten Zellen zu unterscheiden. Es zeigte sich nun, daß die



**Abb. 19: Expression der T-Antigen von den Klonen
pSV VLM 4, 8 und pSV H65 12, 17, 34 in
TC7 Zellen**

TC7 Zellen wurden durch die DEAE-Dextran Methode jeweils mit 5 µg DNA der einzelnen Klone transfiziert und 48 h bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Zellen fixiert und die exprimierten T-Antigene durch Immunperoxidase nachgewiesen. Die dunkel angefärbten Zellkerne zeigen jeweils die Expression von T-Antigen des Klons pSV VLM 4 an. Diese Abb. wird stellvertretend für die anderen Klone aufgeführt, deren T-Antigene ebenso in TC7 Zellen exprimiert werden.

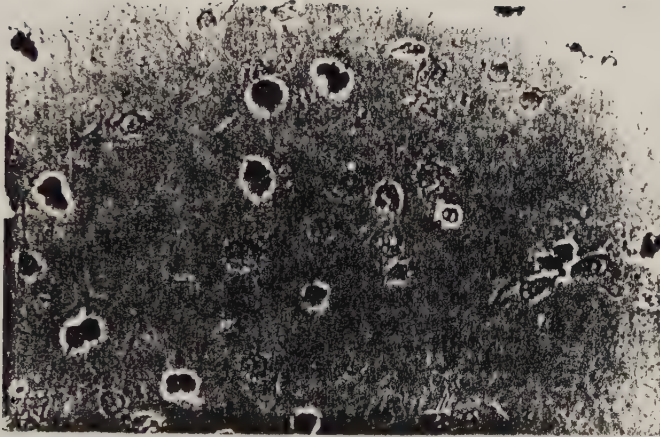


Abb. 20: Expression des wt T-Antigens in TC7 Zellen

Entsprechend der Beschreibung für die Abb. 19 wurden TC7 Zellen mit pSV-wt DNA transfiziert. Nach Fixierung und Immunperoxidase-Färbung weisen die dunkel angefärbten Zellkerne jeweils auf die Expression von wt T-Antigen hin.

T-Antigene sämtlicher Klone Zelltransformationen hervorrufen können. In Abb. 21 wird als Beispiel ein Focus von Rat2 Zellen gezeigt, die durch den Klon pSV VLM 4 transformiert wurden. Dagegen zeigt die Abb. 22 Rat2 Zellen, die nicht transformiert wurden. Weiterhin wurde deutlich, daß die T-Antigene von diesen Klonen Rat2 Zellen mit einer Häufigkeit transformieren können, wie es das wt T-Antigen vermag (Tab. 1).

Zellhaufen der einzelnen Transformationen, die nicht angefarbt wurden, konnten nach 18-20 Tagen mit Hilfe von Klonierringen und Trypsin von der Platte abgelöst und durch Kultivierung in Weichagar gereinigt werden. Auf diese Weise war es möglich, aus Einzelklonen die stabilen Zelllinien Rat SV VLM 4, 8 und Rat SV H65 12, 17, 34 zu etablieren.

4.7 Nachweis und Größenbestimmung der T-Antigene in den transformierten Rat2 Zellen

Die Expression der T-Antigene in den transformierten Rat2 Zellen Rat SV VLM 4, 8 und Rat SV H65 12, 17, 34 wurde durch Immunperoxidase-Färbung getestet. Dabei zeigte sich, daß sämtliche Zellen T-Antigene exprimieren, die ausschließlich im Zellkern lokalisiert sind. Ferner wurde deutlich, daß durch die Kultivierung in Weichagar Zelllinien kloniert wurden, die jeweils einheitlich sind und keine nicht-transformierten Zellen aufweisen. In Abb. 23 werden als Beispiel Rat2 Zellen gezeigt, die durch den Klon pSV VLM 4 transformiert wurden, und die die genannten Eigenschaften aufweisen.

Weiterhin wurde versucht, die Größe dieser T-Antigene zu bestimmen. Dazu wurde jeweils aus den Extrakten der einzelnen Zellen die T-Antigene mit dem monoklonalen Antikörper Pab 108 immunpräzipitiert und anschließend in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Ebenso wurden die Zellextrakte aus COS-1 und Rat SV wt Zellen eingesetzt, da deren T-Antigene wegen ihrer wt Größe als Molekulargewichtsmarker genutzt werden können. Nach

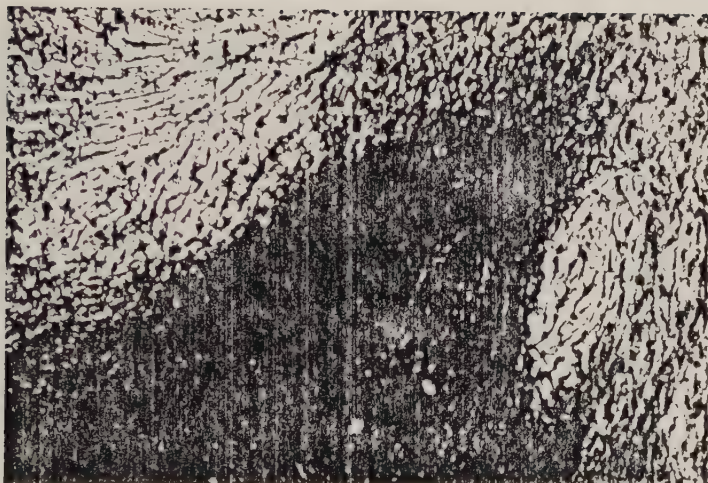


Abb. 21: Darstellung eines Focus von Rat2 Zellen, die durch den Klon pSV VLM 4 transformiert wurden

Rat2 Zellen wurden durch die Kalziumphosphatko-
 präzipitationsmethode jeweils mit 5 μ g DNA der einzelnen
 Klone transfiziert und 12-15 Tage bei 37°C inkubiert. Dann
 wurden die Zellen fixiert und mit Giemsa-Lösung angefärbt.
 Dadurch sind transformierte Rat2 Zellen als dunkel
 angefärbte Zellhaufen (Foci) zu erkennen. Diese Abb. wird
 stellvertretend für die anderen Klone aufgeführt, deren
 T-Antigene ebenso Rat2 Zellen transformieren können.

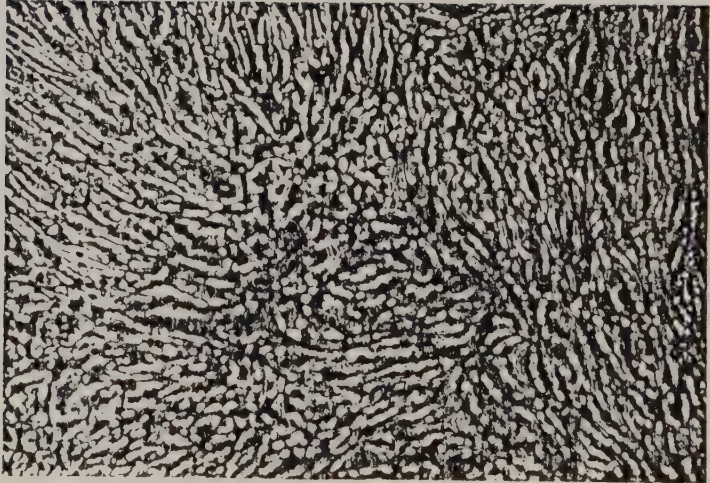


Abb. 22: Darstellung von nicht transformierten Rat2 Zellen

Entsprechend der Beschreibung für die Abb. 21 wurden Rat2 Zellen mit reiner pBR322 DNA transfiziert. Nach Fixierung und Giemsa-Färbung ist keine Bildung von Foci und damit keine Transformation von Zellen zu erkennen.

CLONES	TRANSFORMATION FOCI, % of WT
PSV-H65 12	96
PSV-H65 17	98
PSV-H65 34	101
PSV-VLM 8	101
PSV-VLM 4	94

WT DNA 245,438 FOCI/5 μ g DNA

Tab. 1: Vergleich der Transformationshäufigkeit von T-Antigenen der Klone pSV VLM 4, 8 und pSV H65 12, 17, 34

Rat2 Zellen wurden jeweils mit 5 μ g DNA der einzelnen Klone sowie der pSV-wt DNA transfiziert und 12-15 Tage bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Zellen fixiert und mit Giemsa-Lösung angefärbt. Dadurch konnten die dunkel angefärbten Foci jeweils einer Platte ausgezählt werden, und somit auf die Gesamtzahl von Foci pro 5 μ g transfizierter DNA geschlossen werden.

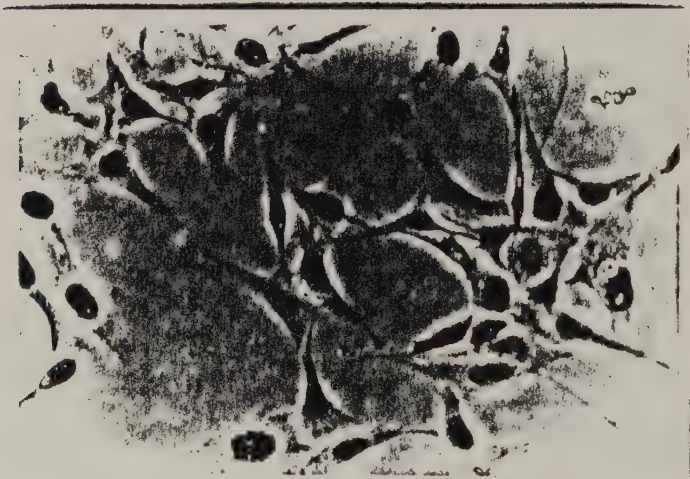


Abb. 23: Expression der T-Antigene in den transformierten Rat2 Zellen

Rat2 Zellen, die nach Transfektion mit den Klonen pSV VLM 4, 8 und pSV H65 12, 17, 34 aus entsprechenden Foci isoliert und in Weichagar gereinigt wurden, konnten als stabile Zelllinien etabliert werden. Die Expression der T-Antigene in diesen Linien konnte nun durch Immunperoxidase-Färbung nachgewiesen werden. Die dunkel angefärbten Zellkerne weisen jeweils die exprimierten T-Antigene in der Zelllinie Rat SV VLM 4 nach. Die Abb. wird stellvertretend für die anderen transformierten Linien aufgeführt, in denen ebenfalls die Expression der T-Antigene gezeigt werden konnte.

Auftrennung und anschließendem Transfer der Proteine auf Nitrozellulose ("Western Blot") konnten die T-Antigene schließlich durch die Biotin-Streptavidin Färbung identifiziert werden. Es zeigte sich, daß die transformierten Linien Rat SV VLM 4, 8 bzw. Rat SV H65 12, 17, 34 T-Antigene exprimieren, deren Größe der des Wildtyps entspricht (Abb. 24). In manchen Experimenten konnte allerdings bei diesen Linien nicht nur eine definierte T-Antigenbande erkannt werden, sondern es zeigte sich zusätzlich eine zweite etwas größere Proteinbande (Abb. 24). Dies deutet darauf hin, das möglicherweise auch 100 kD Super T-Antigene (Levitt et al., 1985) von diesen transformierten Zellen exprimiert werden. Im Falle des T-Antigens der Linie Rat SV H65 12 ist die größere Proteinbande allerdings nur schwach repräsentiert. Dagegen zeigt sich eine zusätzliche kleinere Proteinbande, die aber möglicherweise nur ein Abbauprodukt der größeren darstellt.

4.8 Zellfusionen zwischen den transformierten Linien Rat SV VLM 4, 8 bzw. Rat SV H65 12, 17, 34 und COS-1 bzw. TC7 Zellen

Die transformierten Zelllinien Rat SV VLM 4, 8 und Rat SV H65 12, 17, 34 exprimieren T-Antigene, die durch Immunperoxidase-Färbung nachgewiesen werden konnten. "Western Blot" Analysen wiesen ferner auf T-Antigene hin, die eine wt Größe von etwa 94 kD besitzen. Zellfusionen mit permissiven Affenzellen sollten nun zeigen, ob diese transformierten Zelllinien integrierte SV40 Genome besitzen, die aktiviert werden können.

Die transformierten Zellen Rat SV VLM 4, 8 und Rat SV H65 12, 17, 34 wurden durch PEG mit COS-1 bzw. TC7 Zellen fusioniert und dann bei 37°C 72 h inkubiert (s. 4.1). Anschließend wurde die niedermolekulare DNA isoliert und analysiert.

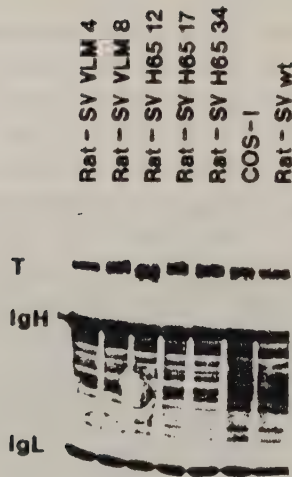


Abb. 24: Größenbestimmung der T-Antigene aus den transformierten Rat2 Zellen

Aus den Extrakten der transformierten Linien Rat SV VLM 4, 8 und Rat SV H65 12, 17, 34 wurden die T-Antigene mit dem monoklonalen Antikörper Pab 108 immunpräzipitiert. Als Molekulargewichtsmarker wurden ebenso die T-Antigene aus den Extrakten der Zelllinien COS-1 bzw. Rat SV wt immunpräzipitiert. Nach der Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgel und dem Transfer auf Nitrozellulose ("Western Blot") wurden die T-Antigene durch die Biotin-Streptavidin Färbung sichtbar gemacht. Ferner sind auch die schweren (IgH) und leichten (IgC) Ketten der Immunglobuline zu erkennen. Diese Proteinbanden sind am linken Bildrand gekennzeichnet.

Dazu wurde die DNA mit BamHI gespalten und in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurde die DNA auf Nitrozellulose transferiert und gegen ^{32}P nick-translatierter pSV-wt DNA hybridisiert. In Abb. 25 zeigt sich, daß in sämtlichen transformierten Zellen eine Aktivierung der viralen Genome möglich ist. Es wird aber deutlich, daß die Exzision der viralen DNA-Sequenzen nur nach Fusion mit COS-1 Zellen zu erzielen ist. Dies zeigt, daß die viralen Genome in diesen Linien intakte "origin"-Bereiche besitzen, die unter der Kontrolle des wt T-Antigens aktiviert werden können. Ferner wird aber deutlich, daß die T-Antigene in diesen Zellen nicht in der Lage sind, eine DNA Replikation zu initiieren. Diese Ergebnisse zeigen somit, daß sich die, durch die klonierten SV40 Genome transformierten Rattenzelllinien, gleich verhalten wie die ursprünglichen Zelllinien VLM und H65/90B. Dies könnte ein guter Hinweis dafür sein, daß die klonierten SV40 Genome (pSV VLM 4, 8 bzw. pSV H65 12, 17, 34) gleiche T-Antigene exprimieren, wie in den ursprünglichen Zelllinien.

4.9 Untersuchungen zur DNA-Bindung der T-Antigene aus den transformierten Rat2 Zellen

Die spezifische Bindung des T-Antigens an den SV40 Replikationsursprung, insbesondere an die Bindungsstelle II, ist primär wichtig für die Initiation der DNA-Replikation (Shortle et al., 1979; Margolskee and Nathans, 1984). Aus diesem Grunde liegt es nahe, die replikationsdefekten T-Antigene aus den transformierten Rat2 Zellen zunächst auf ihre spezifische DNA Bindungsfähigkeit hin zu testen. Als Bindungstest diente ein modifizierter Mc Kay Test (Huber et al., 1985; Hinzpeter et al., 1986). Die mutierten T-Antigene wurden mit dem monoklonalen Antikörper Pab 108 aus den einzelnen Zellextrakten immunpräzipitiert, und dann mit verschiedenen, gespaltenen und $5'^{32}\text{P}$ -endmarkierten DNAs versetzt. Es handelt sich dabei um die HindIII gespaltenen Plasmide pSV-wt (Fanning et al., 1982) und p1097 (Di Maio

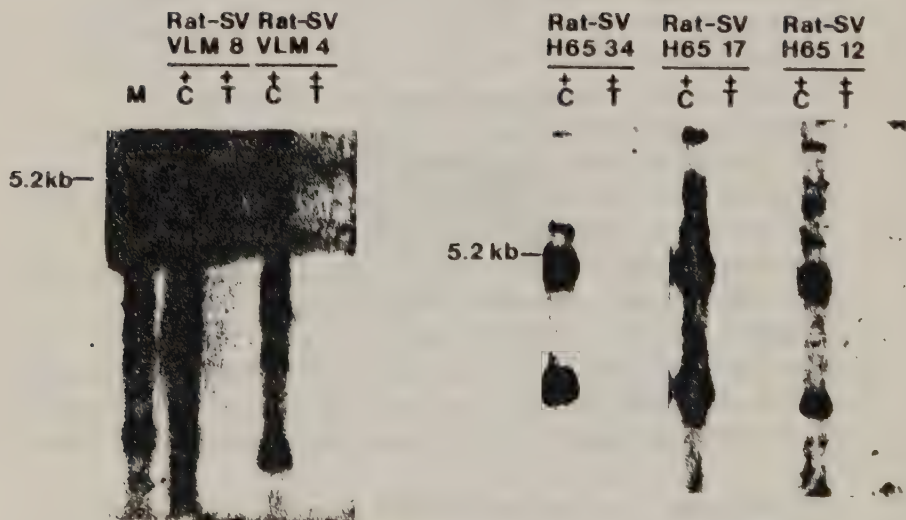


Abb. 25: Zellfusionen zwischen den transformierten Rat2 Zelllinien und COS-1 bzw. TC7 Zellen

Die transformierten Linien Rat SV VLM 4, 8 und Rat SV H65 12, 17, 34 wurden durch PEG mit COS-1 bzw. TC7 Zellen fusioniert. Nach 72 h wurde die niedermolekulare DNA isoliert und analysiert. Dazu wurde die DNA mit BamHI gespalten, in einem 0.8% Agarosegel aufgetrennt und durch "Southern Blot" Hybridisierung bestimmt. Als Hybridisierungsprobe wurde ^{32}P nick-translatierte pSV-wt DNA eingesetzt. (M) entspricht 500 pg BamHI gespaltenen pSV-wt DNA (5243- und 3657 bp).
Länge der Autoradiographie: 20 h

and Nathans, 1982; Huber et al, 1985) sowie um das EcoRI, SalI gespaltene Plasmid pON-wt (Ryder et al., 1985). Der Antikörper Pab 108 bindet ein Epitop am extremen N-Terminus des T-Antigens (Gurney et al., 1986) und beeinflusst die DNA-Bindung des T-Antigens nicht (Ryder et al., 1985; Vakalopoulou, Dissertation 1986).

Das T-Antigen sollte nun an den einzelnen Bindungsstellen eine spezifische Bindung zeigen. Dabei gibt die Bindung an die pSV-wt DNA im wesentlichen das Bindungsverhalten an die Bindungsstelle I des Replikationsursprungs wieder, da das T-Antigen eine höhere Affinität für diese, als für die Bindungsstelle II besitzt (Myers et al., 1981; Jones and Tjian, 1984). Die Bindung des T-Antigens an Bindungsstelle I konnte ferner aber direkt untersucht werden durch das pON-wt Plasmid, das ein synthetisches Oligonukleotid der Bindungsstelle I besitzt. Dagegen wurde das Bindungsverhalten des T-Antigens an die Bindungsstelle II durch die Deletionsmutante pl097 getestet.

Abb. 26 zeigt, daß die T-Antigene aus den transformierten Zellen Rat SV VLM 4, 8 die Bindungsstelle I und II spezifisch binden können, daß aber die Mengen an gebundener DNA sowohl für die Bindungsstelle I wie auch für die Bindungsstelle II geringer ist als für das wt T-Antigen aus COS-1 Zellen. Die T-Antigen Mengen in den verwendeten Zellextrakten wurden im "Western Blot" durch das Biotin-Streptavidin Färbesystem abgeschätzt (Daten nicht gezeigt), und es zeigte sich, daß in diesem Bindungsexperiment zumindest die dreifache Menge an wt T-Antigen gegenüber der Menge an mutierten T-Antigen eingesetzt wurde. Somit erklärt sich die schwächere DNA-Bindung der T-Antigene aus den Linien Rat SV VLM 4, 8 lediglich als eine Folge geringerer Mengen an T-Antigen im Bindungsexperiment. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache kann man postulieren, daß die T-Antigene aus diesen Linien ein Bindungsverhalten zeigen, das dem des wt T-Antigens aus COS-1 Zellen entspricht.

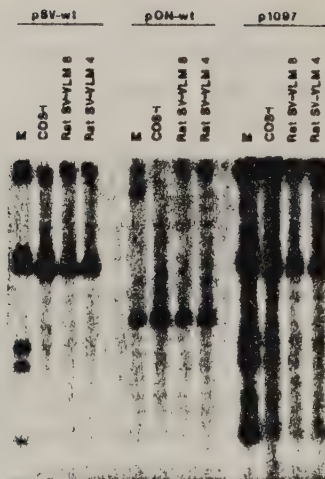


Abb. 26: DNA-Bindung der T-Antigene aus den transformierten Linien Rat SV VLM 4, 8

Aus den Extrakten der transformierten Linien Rat SV VLM 4, 8 wurden die T-Antigene mit dem monoklonalen Antikörper Pab 108 immunpräzipitiert und die Bindung dieser T-Antigene an den einzelnen $5'^{32}\text{P}$ -endmarkierten Fragmenten der Klone pSV-wt, pON-wt und p1097 (s. Text), wie in Methoden (3.10.5) beschrieben, untersucht. Als positive Kontrolle wurde dabei der Extrakt aus COS-1 Zellen verwendet. Die T-Antigen gebundenen DNA-Fragmente wurden schließlich durch Elektrophorese in einem 2% Agarosegel und durch Autoradiographie analysiert. Als Marker DNAs wurden jeweils 12,6 μg der eingesetzten radioaktiv markierten DNAs aufgetragen.

Länge der Autoradiographie für die T-Antigen gebundenen Fragmente der pSV-wt bzw. pON-wt DNA 2 h, dagegen 6 h für die Fragmente der p1097 DNA.

Abb. 27 zeigt, daß die T-Antigene aus den transformierten Linien Rat SV H65 12, 17, 34 die Bindungsstelle I und II des SV40 Replikationsursprungs spezifisch binden können. Ferner wird deutlich, daß die Menge an gebundener DNA für die Bindungsstelle I vergleichbar ist mit der, des wt T-Antigens aus COS-1 Zellen. Dagegen zeigt sich eine stark verminderte Bindung dieser T-Antigene an die Bindungsstelle II. Durch Messung der Radioaktivität in den entsprechenden Gelbereichen konnte festgestellt werden, daß das T-Antigen der Linie Rat SV H65 12 ein DNA Bindungsverhalten für die Bindungsstelle II aufweist, das noch zu 25% dem des wt T-Antigens entspricht. Dagegen zeigen die T-Antigene der Linien Rat SV H65 34, 17 eine DNA Bindung, die nur noch zu 8% bzw. 3% der entspricht, die das wt T-Antigen aus COS-1 Zellen aufweist.

Da die T-Antigen Mengen bereits vor dem Bindungsexperiment abgeschätzt (Daten nicht gezeigt) und dementsprechend eingesetzt wurden, zeigen diese Zahlen das reale Bindungsverhalten der einzelnen T-Antigene.

4.10 Untersuchungen zur ATPase-Aktivität der T-Antigene aus den transformierten Rat2 Zellen

Das T-Antigen besitzt die Fähigkeit ATPase in ADP und anorganisches Phosphat zu spalten. Diese ATPase-Aktivität ist dabei essentiell für die Initiation der viralen DNA-Replikation (Clark et al., 1981; Manos and Gluzman, 1984). Die replikationsdefekten T-Antigene aus den einzelnen transformierten Linien wurden daher auf ihre ATPase-Aktivität hin untersucht. Die Messung der ATPase-Aktivität wurde dabei in einem von Manos und Gluzman (1984) beschriebenen Test durchgeführt, wobei zur Bindung des T-Antigens abweichend von der Vorschrift der monoklonale Antikörper Pab 108 verwendet wurde. Die Menge der jeweils eingesetzten T-Antigene wurde im "Western Blot" bestimmt, wobei die T-Antigene durch das Biotin-Streptavidin Färbesystem identifiziert werden konnten. Als Kontrolle mit

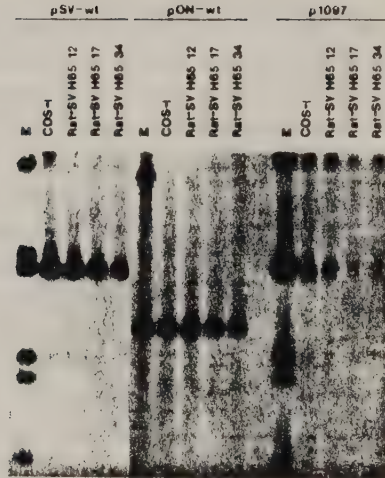


Abb. 27: DNA-Bindung der T-Antigene aus den transformierten Linien Rat SV H65 12, 17, 34

Entsprechend der Beschreibung für die Abb. 26 wurden die T-Antigene der transformierten Linien Rat SV H65 12, 17, 34 auf ihre Bindung an die 5^{32}P -endmarkierten DNA-Fragmente der Klone pSV-wt, pON-wt und p1097 untersucht. Als positive Kontrolle wurde ebenfalls der Extrakt aus COS-1 Zellen verwendet. Als Marker DNAs (M) wurden jeweils 12,6 μg der eingesetzten radioaktiv markierten DNAs aufgetragen. Länge der Autoradiographie: 8 h

wt ATPase-Aktivität wurde der Kernextrakt aus Rat SV wt Zellen verwendet. Die Tab. 2 zeigt die Aktivität der einzelnen T-Antigene nach der Subtraktion des Leerwerts. Ferner wird die spezifische Aktivität und die relative spezifische Aktivität aufgeführt. Es wird deutlich, daß die T-Antigene der Zellen Rat SV VLM 4, 8 und Rat SV H65 17 ATPase-Aktivität besitzen, die jedoch niedriger ist, als die des wt T-Antigens (etwa 20% des wt T-Antigens).

Die Rat SV H65 12 exprimiert dagegen ein T-Antigen, das in etwa wt ATPase-Aktivität aufweist (97% des wt T-Antigens), während das T-Antigen der Linie Rat SV H65 34 eine extrem hohe ATPase-Aktivität besitzt (337% des wt T-Antigens). Diese Daten lassen zumindest für die T-Antigene der Linien Rat SV H65 12, 34 vermuten, daß der Defekt in der Initiation der DNA-Replikation nicht durch eine funktionsbeeinträchtigende ATPase-Aktivität hervorgerufen wird.

4.11 DNA-Replikation der klonierten SV40 Genome

Die Charakterisierung der klonierten SV40 Genome pSV VLM 4, 8 und pSV H65 12, 17, 34 beinhaltetete auch, die Replikationsfähigkeit dieser DNAs in TC7 bzw. COS-1 Zellen zu testen. Dabei sollten in den uninfizierten TC7 Zellen die T-Antigene dieser Klone auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, eine virale DNA Replikation zu initiieren. In COS-1 Zellen sollte dagegen die Funktion des "origin"-Bereichs unter der Kontrolle des wt T-Antigens getestet werden. Dazu wurden TC7 bzw. COS-1 Zellen jeweils mit 1 µg BamHI gespaltener Plasmid DNA durch die DEAE-Dextran Methode transfiziert. Sechs Tage nach Transfektion wurde die niedermolekulare DNA isoliert und analysiert. Dazu wurde die DNA mit BamHI und DpnI gespalten. Das Enzym DpnI schneidet nur DNA, wenn A-Methylierungen der Sequenz GATC vorliegen. Da die Sequenz GATC in eukaryontischen Zellen an A nicht methyliert wird, wenn sich eine DNA in diesen Zellen repliziert hat, kann man somit durch dieses Enzym zwischen "input" und replizierter DNA unterscheiden. Nach der

Tab. 2: ATPase-Aktivität der T-Antigene aus den transformierten Rat2 Zellen^a

Zelllinie	Aktivität ^b (cpm)	spez. Aktivität ^c	rel. spez. Aktivität ^d
Rat SV wt	166.728	23.66	1.0
Rat SV VLM 4	31.628	3.80	0.16
Rat SV VLM 8	35.742	5.49	0.23
Rat SV H65 12	145.637	22.97	0.97
Rat SV H65 17	22.702	4.81	0.21
Rat SV H65 34	446.164	79.73	3.37

^a Kernextrakte aus den aufgelisteten Zellen wurden wie beschrieben mit dem monoklonalen Antikörper Pab 108 immunpräzipitiert. Das mit dem monoklonalen Antikörper gebundene T-Antigen wurde in einem von Manos und Gluzman (1984) beschriebenen Test auf ATPase-Aktivität hin untersucht.

^b Das von γ - ^{32}P ATP in 10 min bei Raumtemperatur abgespaltene $^{32}\text{PO}_4$ wurde durch Cerenkov-Strahlung gemessen. Die aufgeführten Aktivitätswerte wurden erhalten, indem von der Aktivität des mit Pab 108 gebundenen Präzipitats die Aktivität des Leerwerts (Präzipitat ohne Pab 108) subtrahiert wurde.

^c Spezifische Aktivität ($\text{cpm ng}^{-1} \text{ min}^{-1}$) des T-Antigens. Der Gehalt an T-Antigen in den einzelnen Extrakten wurde im "Western Blot" durch die Biotin-Streptavidin Färbung bestimmt (Daten nicht gezeigt).

^d Die spezifische ATPase-Aktivität eines jeden T-Antigens wurde in Relation zur Aktivität des wt T-Antigens gesetzt.

Spaltung wurde die DNA in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, danach auf Nitrozellulose transferiert und gegen ^{32}P nick-translatierte pSV-wt DNA hybridisiert. In Abb. 28 zeigt sich, daß sämtliche Klone in TC7 Zellen nicht replizieren können. Längere Autoradiographien (bis zu 60 h) bestätigten, daß in diesen Zellen keine nachweisbaren replizierten DNA-Moleküle vorliegen. In COS-1 Zellen zeigte sich dagegen für die einzelnen Klone eine unterschiedlich starke DNA-Replikation. Densitometrische Messungen ergaben, daß die Replikation des Klon pSV H65 34 etwa drei- bis vierfach stärker ist als bei den Klonen pSV H65 12, 17. Die Klone pSV VLM 4, 8 zeigten eine DNA-Replikation, die etwa nur ein zehntel der betrug, die für den Klon pSV H65 34 gemessen wurde. pSV-wt bzw. pSV-ELONA DNA (kloniertes Exzisionsprodukt aus ELONA Zellen), die ebenfalls transfiziert wurden, replizierten dagegen sehr gut sowohl in TC7- wie auch in COS-1 Zellen. Ein Vergleich der densitometrischen Daten aus den Replikationen der Klone pSV-wt und pSV ELONA ergab dabei keine signifikanten Unterschiede, während der Vergleich zwischen pSV H65 34 und pSV ELONA eine zumindest um den Faktor 100 höhere DNA-Replikation für den Klon pSV ELONA erkennen ließ. Aus diesen Daten geht hervor, daß die T-Antigene sämtlicher Klone nicht mehr in der Lage sind, die eigenen "origin"-Bereiche zu aktivieren. Ferner wird deutlich, daß diese "origin"-Bereiche nur durch das wt T-Antigen aktiviert werden können, daß aber die Replikationseffizienz dieser Genome im Vergleich zur pSV-wt oder pSV ELONA DNA extrem niedrig ist.

4.12 DNA-Replikation der subklonierten "origin"-Bereiche aus den Klonen pSV VLM 4, 8

Die klonierten SV40 Genome pSV VLM 4, 8, die in TC7 Zellen nicht replizieren konnten, zeigten in COS-1 Zellen eine extrem niedrige DNA-Replikation. Dies könnte bedeuten, daß auch die "origin"-Bereiche in diesen Klonen in ihrer

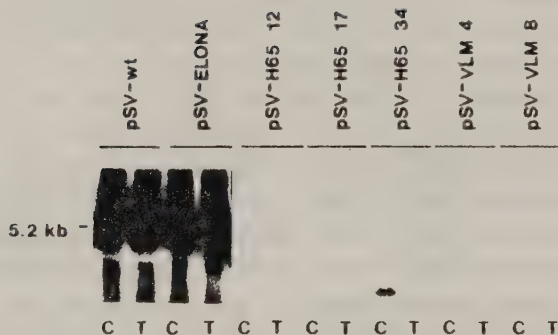


Abb. 28: DNA-Replikation der klonierten SV40 Genome

Die durch BamHI linearisierten Klone pSV VLM 4, 8 und pSV H65 12, 17, 34 wurden durch die DEAE-Dextran Methode in COS-1 bzw. TC7 Zellen transfiziert. Ebenso wurde pSV-wt und pSV ELONA DNA (kloniertes Exzisionsprodukt aus ELONA Zellen) in diese Zellen transfiziert. Sechs Tage nach Transfektion wurde die niedermolekulare DNA isoliert, mit BamHI und DpnI gespalten, in einem 0.8% Agarosegel aufgetrennt und durch "Southern Blot" Hybridisierung bestimmt. Als Hybridisierungsprobe wurde ^{32}P nick-translatierte pSV-wt DNA verwendet. Als Größenmarker ist links von der Abbildung die linearisierte SV40 DNA (5243 bp) angedeutet. Länge der Autoradiographie: 36 h

Funktion beeinträchtigt sein könnten. In Arbeiten von Gluzman and Ahrens (1982), in denen replikationsdefekte SV40 Genome in COS-1 Zellen transfiziert wurden, konnte allerdings gezeigt werden, daß ein replikationsdefektes T-Antigen mit einem wt T-Antigen stark in Konkurrenz treten kann, und daß dadurch die Replikation von DNA-Molekülen, die unter der Kontrolle des T-Antigens stehen, stark vermindert werden kann. Dieses trans-dominante Verhalten von replikationsdefekten T-Antigenen gegenüber wt T-Antigenen konnte ebenfalls in vitro durch Stillman et al. (1985) gezeigt werden. Um nun zu testen, ob die replikationsdefekten T-Antigene der Klone pSV VLM 4, 8 mit dem wt T-Antigen in COS-1 Zellen nur stark konkurrieren, oder ob funktionsbeeinträchtigte "origin"-Bereiche für die niedrige Replikation der Klone verantwortlich sind, wurden die viralen "origin"-Bereiche getrennt auf ihre Replikationsfähigkeit hin getestet.

Dazu wurden die 1.9 kb bzw. 0.9 kb großen HindIII-Fragmente der Klone pSV VLM 4, 8 (s. 4.4), die die viralen "origin"-Bereiche besitzen, in pAT153 subkloniert. Von den erhaltenen Klonen p ORI VLM 1 (+ 1.9 kb Insert von pSV VLM 4, 8) und p ORI VLM 2 (+ 0.9 kb Insert von pSV VLM 8) wurde nun jeweils 1 µg DNA durch die DEAE-Dextran Methode in COS-1 Zellen transfiziert. Drei Tage nach Transfektion wurde die niedermolekulare DNA isoliert und analysiert. Dazu wurde die DNA mit DpnI verdaut und in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurde die DNA auf Nitrozellulose transferiert und gegen ^{32}P nick-translatierter pSV-wt DNA hybridisiert. In Abb. 29 zeigt sich, daß die subklonierten "origin"-Bereiche eine Replikation aufweisen, die durchaus mit der, der pEP DNA (kloniertes "origin"-Fragment der SV40 wt DNA) zu vergleichen ist. Dies wird ebenso in Abb. 30 deutlich, in der die Replikation der pEP DNA mit der, der p ORI VLM 1 DNA (+ 1.9 kb Insert von pSV VLM 4) zu zwei verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion verglichen wird. Im



Abb. 29: DNA-Replikation der subklonierten "origin"-
Bereiche aus den Klonen pSV VLM 4, 8

Die aus den Klonen pSV VLM 4, 8 subklonierten "origin"-
Bereiche pORI VLM 1 (+ 1.9 kb Insert; linke Spur von pSV VLM
4, rechte Spur von pSV VLM 8) und pORI VLM 2 (+ 0.9 kb
Insert von pSV VLM 8) wurden durch die DEAE-Dextran Methode
in COS-1 Zellen transfiziert. Als positive Kontrolle wurde
ebenso die pEP DNA (kloniertes "origin"-Fragment der SV40 wt
DNA) transfiziert. Drei Tage nach Transfektion wurde die
niedermolekulare DNA isoliert, mit DpnI verdaut, in einem
0.8% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und durch
"Southern Blot" Hybridisierung analysiert. Als
Hybridisierungsprobe wurde ^{32}P nick-translatierte pSV-wt DNA
verwendet. Am linken Bildrand werden die drei verschiedenen
DNA-Formen gekennzeichnet, Form I (ringförmig,
"supercoiled"), Form II (ringförmig, entspannt) und
Form III (linear).

Länge der Autoradiographie: 8 h

Unterschied zu Abb. 29 wurden hier die Isolate der niedermolekularen DNA zusätzlich mit BamHI gespalten, bevor die DNA elektrophoretisch aufgetrennt wurde. Geringfügige Unterschiede in der Replikation dieser Klone könnten dabei durch die unterschiedlichen Größen von p ORI VLM 1 (5.6 kb) und pEP DNA (4.8 kb) hervorgerufen werden. Um dies zu klären, wurden nun die subklonierten HindIII/SphI "origin"-Fragmente (s. 4.4) beider Klone auf Replikation hin getestet.

In Abb. 30 zeigt sich, daß das subklonierte HindIII/SphI-Fragment (pH-S VLM) aus dem Klon pSV VLM 4 in COS-1 Zellen nach einem bzw. zwei Tagen eine DNA-Replikation aufweist, die durchaus mit der zu vergleichen ist, die das entsprechende klonierte Fragment aus der SV40 wt DNA (pH-S wt) aufweist. Ferner wird deutlich, daß die Replikation dieser Subklone weitaus höher ist (Faktor 6-8), als die, der in gleichen Mengen transfizierten pEP- bzw. p ORI VLM 1 DNA. Dies läßt einen deutlichen Einfluß der Größe eines DNA-Moleküls auf seine Replikationseffizienz vermuten. Aus diesen Daten geht eindeutig hervor, daß die extrem niedrige Replikation der Klone pSV VLM 4, 8 in COS-1 Zellen nicht durch funktionsbeeinträchtigte "origin"-Bereiche bedingt sein kann. Ferner wird deutlich, daß auch die zellulären Sequenzen, die im Klon p ORI VLM 1 vorhanden sind, keine inhibierende Funktion besitzen. Vielmehr scheint eine mögliche Wechselwirkung zwischen dem replikationsdefekten- und dem wt T-Antigen der limitierende Faktor für die Replikation dieser Klone zu sein.

4.13 Untersuchungen zur DNA-Replikation von SV40 Genomen, in denen das BamHI/BstXI-Fragment der frühen Region jeweils durch das entsprechende Fragment der Klone pSV VLM 4, 8 bzw. pSV H65 12 ersetzt wurde

Die T-Antigene der Klone pSV VLM 4, 8 und pSV H65 12 sind nicht mehr in der Lage ihre eigenen "origin"-Bereiche zu aktivieren (s. 4.11). Da zumindest die "origin"-Bereiche der

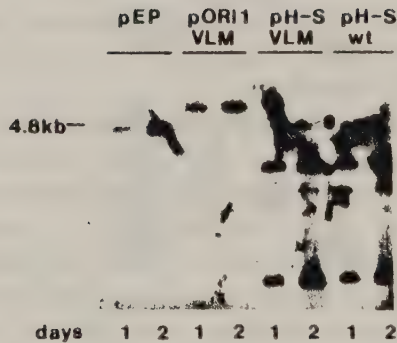


Abb. 30: Vergleich der DNA-Replikation von subklonierten "origin"-Fragmenten zu zwei verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion

Das 200 bp große HindIII/SphI-Fragment (5171-128) aus dem Klon pSV VLM 4 wurde ebenso in pAT subkloniert, wie das entsprechende Fragment aus der SV40 wt DNA. Von den erhaltenen Klonen pH-S VLM und pH-S wt wurde jeweils 1 µg DNA in COS-1 Zellen transfiziert und auf Replikation getestet. Ebenso wurden pEP- und pORI VLM 1 DNA (+ 1.9 kb Insert von pSV VLM 4) in COS-1 Zellen transfiziert. Einen bzw. zwei Tage nach Transfektion wurde die niedermolekulare DNA isoliert, mit BamHI und DpnI verdaut, in einem 0.8% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und durch "Southern Blot" Hybridisierung analysiert. Als Hybridisierungsprobe wurde ^{32}P nick-translatierte pSV-wt DNA verwendet. Als Größenmarker ist am linken Bildrand die linearisierte pEP DNA (4.8 kb) angedeutet.

Länge der Autoradiographie: 6 h

Klone pSV VLM 4, 8 unter der Kontrolle des wt T-Antigens normal replizieren können (s. 4.12), deutet vieles daraufhin, daß die T-Antigene dieser Klone replikationsdefekt sind. Um dies aber eindeutig behaupten zu können, müßte gezeigt werden, daß diese T-Antigene auch den "origin" des SV40 wt nicht mehr aktivieren können. Dazu wurde jeweils das 2.2 kb große BamHI/BstXI-Fragment der einzelnen Klone an Stelle des entsprechenden wt Fragments in das SV40 Genom des Klons pK1 (Gluzman and Ahrens, 1982) ligiert. Der Klon pK1 besitzt die vollständige SV40 DNA (Stamm 776), die über die EcoRI Schnittstelle in den pMK16#6 ligiert ist. Von den erhaltenen Klonen pK1-B-B-SV VLM 4, 8 und pK1-B-B-SV H65 12 wurde jeweils 1 µg EcoRI gespaltene DNA in TC7 Zellen transfiziert. Sechs Tage nach Transfektion wurde die niedermolekulare DNA isoliert und analysiert. Dazu wurde die DNA mit BamHI und DpnI gespalten und in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurde die DNA auf Nitrozellulose transferiert und gegen ^{32}P nick-translatierte pSV-wt DNA hybridisiert.

In Abb. 31 zeigt sich, daß der Klon pK1-B-B-SV H65 12 nicht mehr in der Lage ist in TC7 Zellen zu replizieren. Damit wird deutlich, daß das T-Antigen des Klons pSV H65 12 replikationsdefekt ist. Überraschenderweise zeigten aber die Klone pK1-B-B-SV VLM 4, 8 in TC7 Zellen eine DNA-Replikation, die durchaus mit der, der pSV-wt DNA zu vergleichen ist. Die T-Antigene der Klone pSV VLM 4, 8 sind somit replikationsaktiv. Es wird aber deutlich, daß diese T-Antigene nur den wt "origin" aktivieren können, während die "origin"-Bereiche in den Klonen pSV VLM 4, 8 nur unter der Kontrolle des wt T-Antigens eine Replikation aufweisen können.

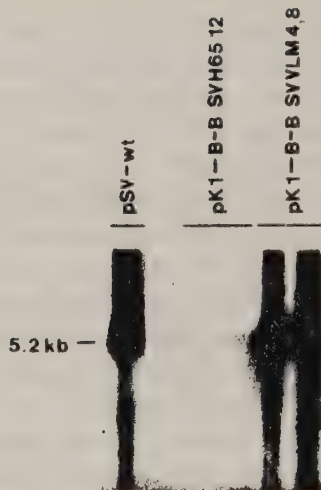


Abb. 31: DNA-Replikation von SV40 Genomen, in denen das BamHI/BstXI-Fragment der frühen Region jeweils durch das entsprechende Fragment der Klone pSV VLM 4, 8 bzw. pSV H65 12 ersetzt wurde

An Stelle des entsprechenden wt Fragments wurde in das SV40 Genom des Klons pK1 (Gluzman and Ahrens, 1982) jeweils das 2.2 kb große BamHI/BstXI-Fragment der Klone pSV VLM 4, 8 bzw. pSV H65 12 ligiert. Von den erhaltenen Klonen pK1-B-B-SV VLM 4 (linke Spur), 8 (rechte Spur) und pK1-B-B-SV H65 12 wurde jeweils 1 µg EcoRI gespaltene DNA in TC7 Zellen transfiziert. Als positive Kontrolle wurde ebenso BamHI gespaltene pSV-wt DNA transfiziert. Sechs Tage nach Transfektion wurde die niedermolekulare DNA isoliert, mit BamHI und DpnI verdaut, in einem 0.8% Agarosegel aufgetrennt und durch "Southern Blot" Hybridisierung analysiert. Als Hybridisierungsprobe wurde ^{32}P nick-translatierte pSV-wt DNA verwendet. Als Größenmarker ist am linken Bildrand die linearisierte SV40 DNA (5243 bp) angedeutet.
Länge der Autoradiographie: 14 h

4.14 Untersuchungen zur DNA-Replikation der Klone pSV VLM 4, 8 bzw. pSV H65 12, 17, 34 nach Kotransfektion mit klonierten SV40 "origin"-Fragmenten

In 4.11, 4.13 konnte gezeigt werden, daß die T-Antigene der Klone pSV VLM 4, 8 zwar nicht ihre eigenen, doch aber den SV40 wt "origin" aktivieren können. Es stellte sich nun die Frage, ob diese Art von Mutationen möglicherweise auch bei den T-Antigenen der Klone pSV H65 17, 34 vorliegen könnte. Eine Möglichkeit dies zu testen, wurde in 4.13 aufgezeigt. Eine weitere Möglichkeit nach solch einer Mutation zu suchen stellt die Kotransfektion dieser Klone und des wt "origin" in TC7 Zellen dar. Hierbei wird die Replikation eines wt "origin" in trans getestet.

Für die Kotransfektion wurde nun von den einzelnen Klonen und dem pEP Plasmid (kloniertes SV40 wt "origin"-Fragment) jeweils 1 µg DNA eingesetzt. Die DNA wurde durch die DEAE-Dextran Methode in die Zellen eingeführt. Drei Tage nach Transfektion wurde die niedermolekulare DNA isoliert und analysiert. Dazu wurde die DNA mit BamHI und DpnI verdaut und in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurde die DNA auf Nitrozellulose transferiert und gegen ^{32}P nick-translatierte pSV-wt DNA hybridisiert.

In Abb. 32 (links) zeigt sich eine Replikation der pEP DNA nach Kotransfektion mit den Klonen pSV VLM 4, 8 und pSV H65 17, 34. Die T-Antigene dieser Klone können somit den SV40 wt "origin" aktivieren. Dagegen führte die Kotransfektion mit dem Klon pSV H65 12 zu keiner DNA-Replikation des pEP Plasmids. Dies bestätigt das Ergebnis aus 4.13, wonach das T-Antigen dieses Klons replikationsdefekt ist. Eine Replikation der pEP DNA ist ebenso zu erkennen nach der Kotransfektion mit dem Klon pIn-1-13 (Tegtmeyer et al., 1984; Levinson et al., 1984; Schnierle, Diplomarbeit 1986). Dieser Klon exprimiert ein replikationsaktives T-Antigen, besitzt aber in der BglI Schnittstelle des "origin" eine

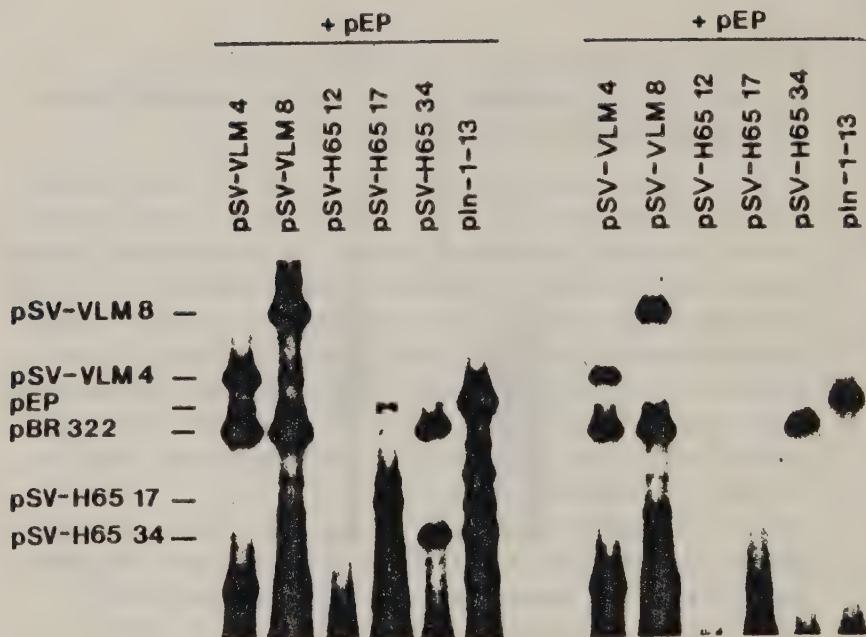


Abb. 32: DNA-Replikation der Klone pSV VLM 4, 8 bzw. pSV H65 12, 17, 34 nach Kotransfektion mit pEP DNA (kloniertes SV40 wt "origin"-Fragment)

Die Klone pSV VLM 4, 8 bzw. pSV H65 12, 17, 34 wurden jeweils mit pEP DNA (kloniertes SV40 wt "origin"-Fragment) durch die DEAE-Dextran Methode in TC7 Zellen kotransfiziert. Von den einzelnen Plasmiden wurde jeweils 1 µg zirkuläre DNA eingesetzt. Drei Tage nach Transfektion wurde die niedermolekulare DNA isoliert, mit BamHI und DpnI verdaut, in einem 0.8% Agarosegel aufgetrennt und durch "Southern Blot" Hybridisierung analysiert. Zur Identifizierung der transformierten Klone wurde mit ³²P nick-translatierter pSV-wt DNA hybridisiert (linke Abb.), während zum Nachweis der zellulären DNA-Sequenzen in den Klonen pSV VLM 4, 8 mit dem klonierten EcoRI Fragment (1.0 kb) aus diesen Klonen hybridisiert wurde (rechte Abb). Am linken Bildrand sind die einzelnen DNA-Banden gekennzeichnet.

Länge der Autoradiographie: jeweils 14 h

Insertion, so daß dieser "origin" nicht aktiviert werden kann.

Überraschenderweise führten aber auch die Transfektionen, nach denen pEP DNA replizierte, zu einer Replikation der kotransfizierten Klone. Es handelt sich dabei um die Klone pSV VLM 4, 8 und pSV H65 17, 34. Ebenso ist für den Klon pIn-1-13 nach Kotransfektion mit pEP DNA eine Doppelbande zu erkennen, die auf eine replizierte Form dieser DNA hinweist. Da all diese Klone ohne das pEP Plasmid in TC7 Zellen nicht replizieren können, ist es vorstellbar, daß nach Kotransfektion mit pEP DNA Rekombinationen in den "origin"-Bereich stattfinden, die dazu führen können, daß die T-Antigene dieser Klone ihre eigenen "origin"-Bereiche nun aktivieren können.

Die Klone pSV VLM 4, 8 besitzen an Stelle des zweiten 72 bp "repeat" des Enhancer zelluläre DNA-Sequenzen (EcoRI-Fragment (1.0 kb) - s. 4.4). Wenn diese DNA-Sequenzen nun einen Einfluß darauf hätten, daß diese "origin"-Bereiche nicht mehr durch die T-Antigene der Klone aktiviert werden können, so sollten diese DNA-Sequenzen nach Kotransfektion mit pEP DNA möglicherweise deletiert sein. Um dies zu testen wurde der Nitrozellulosefilter, der für die Abb. 32 (links) mit pSV-wt DNA hybridisiert wurde, gewaschen und dann mit kloniertem ^{32}P nick-translatiertem EcoRI-Fragment (1.0 kb) hybridisiert. In Abb. 32 (rechts) zeigt sich jedoch, daß die Klone pSV VLM 4, 8 diese zelluläre DNA-Sequenzen nach wie vor besitzen. Durch den Plasmidanteil des klonierten EcoRI-Fragments hybridisierten zusätzlich die pBR322 Anteile sämtlicher Klone und der pEP DNA. Durch den Vergleich mit den ursprünglichen Klonen konnte ferner gezeigt werden, daß die replizierten Klone pSV VLM 4, 8 in Abb. 32 keine erkennbaren Größenunterschiede aufweisen (Daten nicht gezeigt). Dies läßt nun vermuten, daß nicht die zellulären DNA-Sequenzen dieser Klone, sondern möglicherweise die viralen "origin"-Bereiche selbst dafür verantwortlich sind,

daß sie nicht mehr durch die eigenen T-Antigene aktiviert werden können.

Die viralen "origin"-Bereiche des SV40 wt und der Klone pSV VLM 4, 8 besitzen jeweils ein 200 bp großes HindIII/SphI-Fragment (s. 4.4). Dieses Fragment des SV40 wt (pH-Swt) wurde nun in Kotransfektion mit den Klonen pSV VLM 4, 8 an Stelle der pEP DNA eingesetzt. Damit sollte getestet werden, ob diese 200 bp alleine ausreichen, oder ob DNA-Sequenzen des Enhancer-Bereichs gebraucht werden, damit die Klone pSV VLM 4, 8 nach möglicher Rekombination erfolgreich replizieren können. In Abb. 33 zeigt sich, daß nach Kotransfektion mit pH-Swt Plasmid sowohl die Klone pSV VLM 4, 8 als auch das pH-Swt Plasmid replizieren können. Damit wird deutlich, daß lediglich das HindIII/SphI-Fragment des SV40 wt für mögliche Rekombinationen benötigt wird. Gleichzeitig konnte aber auch gezeigt werden, daß nach Kotransfektion mit dem entsprechenden HindIII/SphI-Fragment (pH-S VLM) aus dem Klon pSV VLM 4 keinerlei DNA-Replikation möglich war.

Dies unterstreicht, daß ausschließlich die DNA-Sequenzen des SV40 wt (Stamm 776) benötigt werden, damit nach Kotransfektion die Klone pSV VLM 4, 8 selbst replizieren können. Ebenso führte der Versuch, in dem der Klon pSV H65 34 mit subklonierten HindIII/SphI-Fragment des SV40 wt (Stamm 776) kotransfiziert wurde, zu einer Replikation der beiden DNAs (Abb. 34). Gleichzeitig konnte aber auch hier eine Kotransfektion mit dem eigenen HindIII/SphI-Fragment (pH-S H65 34) zu keiner DNA-Replikation des Klons pSV H65 34 führen (Abb. 34).

Es stellte sich nun die Frage, weshalb die "origin"-Bereiche der Klone pSV VLM 4, 8 bzw. pSV H65 34 nicht mehr durch die eigenen T-Antigene aktiviert werden können. Da alle drei Klone an der Stelle 5209 eine Transition (C T) im Vergleich zur SV40 wt DNA (Stamm 776) aufweisen, deutet vieles darauf hin, daß dieser Basenaustausch möglicherweise den entscheidenden Faktor darstellt. Dennoch mußte abgeklärt

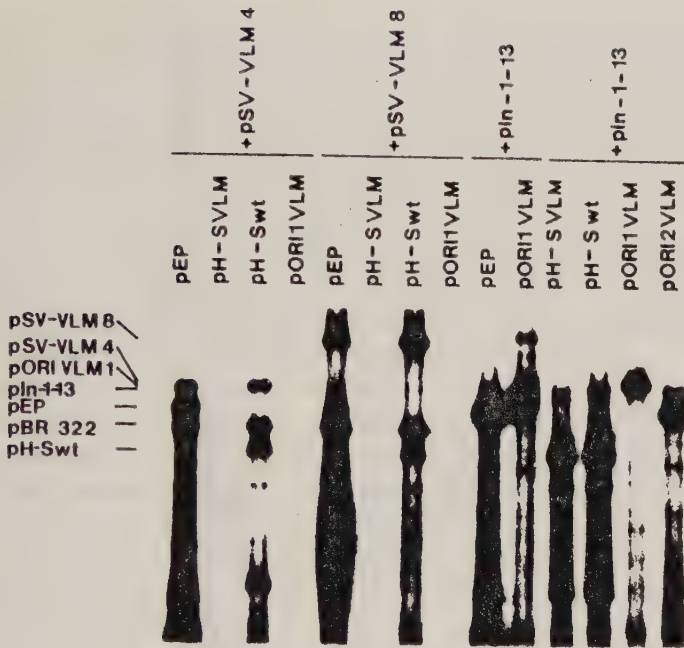


Abb. 33: DNA-Replikation der Klone pSV VLM 4, 8 nach Kotransfektion mit den subklonierten HindIII/SphI "origin"-Fragmenten (pH-S wt bzw. pH-S VLM)

Die Klone pSV VLM 4, 8 wurden jeweils mit dem subklonierten HindIII/SphI-Fragment der SV40 wt DNA (pH-S wt) in TC7 Zellen kotransfiziert (jeweils 1 µg DNA). Ebenso wurden diese DNAs mit dem subklonierten HindIII/SphI-Fragment (pH-S VLM aus dem Klon pSV VLM 4) kotransfiziert (jeweils 1 µg DNA). Als Kontrollen wurden ferner pEP-, pORI 1 VLM-, pORI 2 VLM- (s. 4.12), pH-S wt- (s. 4.4) und pH-S VLM DNA jeweils mit dem Klon pIn-1-13 kotransfiziert (jeweils 1 µg DNA). Drei Tage nach Transfektion wurde die niedermolekulare DNA isoliert, mit BamHI und DpnI verdaut, in einem 0.8% Agarosegel aufgetragen und durch "Southern Blot" Hybridisierung analysiert. Als Hybridisierungsprobe wurde ³²p nick-translatierte pSV-wt DNA verwendet. Am linken Bildrand sind die einzelnen DNA-Banden gekennzeichnet. Länge der Autoradiographie: 20 h

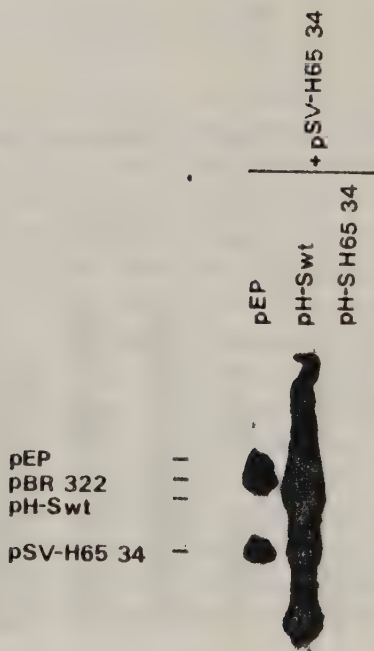


Abb. 34: DNA-Replikation des Klon pSV H65 34 nach Kotransfektion mit den subklonierten HindIII/SphI "origin"-Fragmenten (pH-S wt, pH-S H65 34)

Der Klon pSV H65 34 wurde mit dem subklonierten HindIII/SphI-Fragment der SV40 wt DNA (pH-S wt) durch die DEAE-Dextran Methode in TC7 Zellen transfiziert (jeweils 1 µg DNA). Ebenso wurde dieser Klon mit dem eigenen subklonierten HindIII/SphI-Fragment (pH-S H65 34) und zur Kontrolle auch mit pEP DNA kotransfiziert (jeweils 1 µg DNA). Drei Tage nach Transfektion wurde die niedermolekulare DNA isoliert, mit BamHI und DpnI verdaut, in einem 0.8% Agarosegel aufgetrennt und durch "Southern Blot" Hybridisierung analysiert. Als Hybridisierungsprobe wurde ³²P nick-translatierte pSV-wt DNA verwendet. Am linken Bildrand sind die einzelnen DNA-Banden gekennzeichnet. Länge der Autoradiographie: 8 h

werden, ob die Deletion (A) an der Stelle 81 in den DNAs der Klone pSV VLM 4, 8 nicht einen Einfluß auf die Replikation haben könnte. Studien, in denen die Replikation des "minimal origin" getestet wurde, zeigten, daß in vitro der Promotor und Enhancer einen nur sehr geringen oder gar keinen Einfluß haben (Li and Kelly, 1985; Stillman et al., 1985; Li and Kelly, 1986), daß aber in vivo diese Kontrollelemente die Replikation erheblich fördern können (De Lucia et al, 1986). Um nun die Wirkung der Deletion (81) auf die Replikation hin zu testen, wurde das Plasmid pH-N (VLM)-N-S (wt) konstruiert, in dem das HindIII/NcoI-Fragment (5171-37) des Klons pH-S VLM (Subklon von pSV VLM 4) mit dem NcoI/SphI-Fragment (37-128) des wt Klons pH-S wt ligiert wurde. Dieser "Hybrid-Klon" besitzt daher nur noch die Transition an der Stelle 5209, während in seinem Promotor-Bereich ausschließlich wt DNA-Sequenzen vorliegen. Dieser Klon wurde nun jeweils mit den Klonen pSV VLM 4, 8 in TC7 Zellen kotransfiziert und auf Replikation hin getestet. In Abb. 35 zeigt sich, daß keinerlei DNA-Replikation nach dieser Kotransfektion zu beobachten ist. Dagegen findet sich DNA-Replikation nach Kotransfektion mit pEP bzw. pH-S wt DNA. Diese Daten sprechen eindeutig dafür, daß nicht die Deletion (A) im Promotor-Bereich ausschlaggebend ist, sondern daß die Transition an der Stelle 5209 vermutlich den entscheidenden Faktor darstellt.

Es stellte sich nun die Frage, ob dieser Basenaustausch einen direkten Einfluß auf die DNA-Bindung des T-Antigens der Klone pSV VLM 4, 8 bzw. pSV H65 34 ausübt. Das Basenpaar 5209 liegt zwar außerhalb auf der späten Seite der T-Antigen Bindungsstelle I, wird aber in DNase-Schutzexperimenten durch das gebundene T-Antigen geschützt. Um nun zu testen, ob das T-Antigen des Klons pSV VLM 4 in der Lage ist, den eigenen "origin" zu binden, wurde das T-Antigen der Rat2 Linie, die durch den Klon pSV VLM 4 transformiert wurde, mit dem monoklonalen Antikörper Pab 108 immunpräzipitiert und in einen modifizierten Mc Kay Test (Huber et al., 1985;



**Abb. 35: DNA-Replikation der Klone pSV VLM 4, 8 nach
Kotransfektion mit dem Hybrid-Klon
pH-N (VLM)-N-8 (wt)**

Der Klon pH-N (VLM)-N-8 (wt) wurde konstruiert, indem das HindIII/NcoI-Fragment des Klons pH-S VLM (Subklon von pSV VLM 4) mit dem NcoI/SphI-Fragment der SV40 wt DNA ligiert wurde. Dieser Klon wurde jeweils mit den Klonen pSV VLM 4, 8 in TC7 Zellen kotransfiziert (jeweils 1 µg DNA). Ebenso wurden die Klone pSV VLM 4, 8 mit pEP bzw. pH-S wt DNA kotransfiziert (jeweils 1 µg DNA). Drei Tage nach Transfektion wurde die niedermolekulare DNA isoliert, mit BamHI und DpnI gespalten, in einem 0.8% Agarosegel aufgetrennt und durch "Southern Blot" Hybridisierung analysiert.

Als Hybridisierungsprobe wurde ^{32}P nick-translatierte pSV-wt DNA verwendet. Am linken Bildrand sind die einzelnen DNA-Banden gekennzeichnet.

Länge der Autoradiographie: 8 h

Hinzpeter et al., 1986) eingesetzt. Als DNA wurde der mit HindIII/SphI gespaltene und 5'³²P-endmarkierte Klon pH-S VLM zugesetzt. Zur Kontrolle wurden sowohl das entsprechende markierte Fragment der SV40 wt DNA (pH-S wt) wie auch das wt T-Antigen aus COS-1 Zellen in das Bindungsexperiment mit eingebracht. In Abb. 36 zeigt sich, daß das T-Antigen des Klon pSV VLM 4 nicht nur das wt "origin"-Fragment (pH-S wt), sondern auch das eigene (pH-S VLM) binden kann. Dabei ist kein signifikanter Unterschied im Bindungsverhalten des T-Antigens an den beiden "origin"-Fragmenten zu erkennen. Da dieses T-Antigen aber im Gegensatz zum wt T-Antigen nur noch einen "origin" replizieren kann, der an der Position 5209 ein C besitzt, ist es naheliegend zu vermuten, daß eine Mutation in diesem T-Antigen vorliegt, die eine mögliche Wechselwirkung zwischen T-Antigen und zellulären Faktoren in diesem DNA-Bereich verhindert.

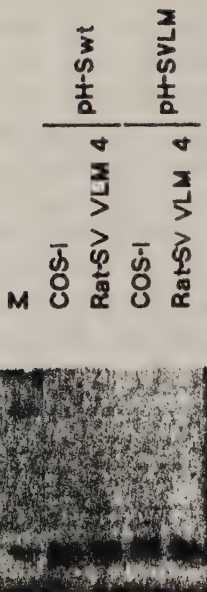


Abb. 36: Vergleich der DNA-Bindung des T-Antigens aus der Zelllinie Rat SV VLM 4 an den HindIII/SphI-Fragmenten der Klone pH-S wt bzw. pH-S VLM

Aus dem Extrakt der transformierten Linie Rat SV VLM 4 wurde das T-Antigen mit dem monoklonalen Antikörper Pab 108 immunpräzipitiert und die Bindung dieses T-Antigens an den 5^{32}P -endmarkierten HindIII/SphI "origin"-Fragmenten der Klone pH-S wt bzw. pH-S VLM, wie in Methoden (3.10.5) beschrieben, untersucht. Als Kontrolle wurde dabei der Extrakt aus COS-1 Zellen verwendet. Die T-Antigen gebundenen DNA-Fragmente wurden schließlich durch Elektrophorese in einem 2% Agarosegel und durch Autoradiographie analysiert. Als Marker DNA wurde 12,5 ng der eingesetzten radioaktiv markierten pH-S wt DNA aufgetragen.
Länge der Autoradiographie: 1 h

5. DISKUSSION

Zellfusionen zwischen SV40 transformierten Zellen und COS-1 Zellen führten unter der Kontrolle des T-Antigens aus COS-1 Zellen zu einer Aktivierung von integrierten viralen Genomen, die letztlich dann aus der Zell DNA freigesetzt werden (Botchan et al., 1979; Gluzman, 1984; Gluzman and Ahrens, 1982; Abb. 5, 6). Da COS-1 Zellen einen defekten SV40 "origin" besitzen, betrifft die Aktivierung nur die integrierte virale DNA der SV40 transformierten Zellen (Gluzman et al., 1981; Conrad et al., 1982). Virale Exzisionsprodukte, die nach Fusion mit COS-1 Zellen in den SV40 transformierten Zellen (Abb. 5, 6) gefunden wurden, zeigten entweder ein einfaches Muster, das lediglich DNA-Moleküle einer bestimmten Größe aufwies, die allerdings in verschiedenen Konformationen vorlagen (VLM, THK-1t und ELONA), oder aber ein komplexes Muster, das vielen unterschiedlich großen DNA-Molekülen entsprach (MKSA, H65/90B, C0625 und C0631). Spaltungen mit BamHI konnten die Exzisionsprodukte aus den Zellen VLM und ELONA weiter vereinfachen, während dies für die freigesetzte DNA aus den Zellen MKSA, H65/90B, C0625 und C0631 nicht möglich war (Abb. 5, 6). Ähnliche Muster von Exzisionsprodukten wurden auch in vielen anderen SV40 transformierten Zellen gefunden (Botchan et al., 1979; Manos and Gluzman, 1984; Bullock et al., 1984). Studien, in denen die Struktur der integrierten viralen DNA analysiert wurde, legten dar, daß das einfache Muster von Exzisionsprodukten auf virale DNA Integrationen zurückzuführen ist, die "Kopf-Schwanz" Duplikationen aufweisen. Zur Freisetzung dieser viralen DNA soll dabei einer Replikation die homologe Rekombination zwischen diesen duplizierten Sequenzen folgen (Pellegrini et al., 1984; Miller et al., 1984). Das komplexe Muster von Exzisionsprodukten wird dagegen erhalten, wenn in der Zell DNA Einzelkopien des SV40 vorliegen, die keine Duplikationen aufweisen. Bei der Exzision dieser DNA-Sequenzen sind dabei

Rekombinationen denkbar, die zwischen kleinen homologen Sequenz-Bereichen in der viralen und zellulären DNA auftreten können (Bullock et al., 1984).

Die SV40 Integrationsmuster der transformierten Zelllinien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, scheinen sich möglicherweise auch im Muster ihrer Exzisionsprodukte nach Fusion mit COS-1 Zellen auszudrücken. Die grobe Restriktionsanalyse der integrierten viralen DNAs läßt vermuten, daß in jenen Zellen "Kopf-Schwanz" Duplikationen vorliegen, die auch nach Fusion mit COS-1 Zellen einfache Muster von Exzisionsprodukten zeigen (VLM, Abb. 5, 8 A; THK-1t, Abb. 5, 9 C; ELONA, Abb. 6; Matz, pers. Mitteilung). In MKSA Zellen, die ein sehr komplexes Muster der Exzisionsprodukte aufweisen, gibt es dagegen keine Hinweise auf "Kopf-Schwanz" Duplikationen (Abb. 5, 8 B).

Zellfusionen zwischen diesen transformierten Linien und TC7 Zellen führten im Gegensatz zu Fusionen mit COS-1 Zellen in sechs von sieben Zelllinien zu sehr wenigen oder gar keinen Exzisionsprodukten (Abb. 5-7). Diese Daten zeigen deutlich, daß die T-Antigene in den meisten SV40 transformierten Zellen zumindest Defekte zeigen, oder völlig inaktiv sind in der Initiation der viralen DNA-Replikation (Abb. 5-7).

Diese T-Antigene wurden ferner auf ihre biochemischen Aktivitäten hin untersucht, wobei sich die T-Antigene der Zelllinien VLM und H65/90B als besonders interessant erwiesen (Huber et al., 1985; s. 1.5, 4.3). Da zumindest das T-Antigen aus VLM Zellen neue biochemische Eigenschaften erkennen ließ, die wichtig für die DNA-Replikation des SV40 sein könnten, wurden die viralen Genome, die für diese T-Antigene kodieren, isoliert und kloniert. Ähnlich wie in Arbeiten von Gluzman and Ahrens (1982) beschrieben, wurden die viralen Genome nach Fusion mit COS-1 Zellen als amplifizierte Exzisionsprodukte isoliert und in dem Vektor pBR322 kloniert. Es stellte sich nun die Frage, ob die erhaltenen Klone tatsächlich die viralen DNA-Sequenzen besitzen, die nach Fusion mit COS-1 Zellen als

Exzisionsprodukte zu erkennen sind. Dazu wurde ein Größenvergleich zwischen den mit BamHI gespaltenen Klonen und den linearisierten Exzisionsprodukten herangezogen (Abb. 5). Es wird deutlich, daß die klonierten DNA-Fragmente sowohl aus den VLM- wie auch aus den H65/90B Zellen jeweils eine Größe besitzen, die mit jener zu vergleichen ist, die die entsprechenden linearen Exzisionsprodukte aufweisen. Dies kann als guter Hinweis dafür betrachtet werden, daß tatsächlich die viralen Exzisionsprodukte kloniert werden konnten.

Ferner stellte sich die Frage, ob die klonierten Exzisionsprodukte überhaupt die ursprüngliche Struktur der integrierten viralen DNA wiedergeben, oder ob diese Exzisionsprodukte möglicherweise das Ergebnis von Rekombinationen sind, die während der Amplifikation und Exzision stattfinden. Restriktionsanalysen und "Southern Blot" Hybridisierungen ließen sowohl in den klonierten Exzisionsprodukten wie auch in der genomischen DNA der Zelllinie VLM ein 1.0 kb großes EcoRI-Fragment erkennen, das zelluläre DNA-Sequenzen besitzt (Abb. 12, 13). Diese zellulären DNA-Sequenzen finden sich dabei in jenen Fragmenten (BglII, SstI) der Zell DNA, in denen auch die integrierten SV40 DNA-Sequenzen vorliegen (Abb. 13, Spuren 3, 4). Da die klonierten Exzisionsprodukte jeweils dieses EcoRI-Fragment besitzen, könnte dies als Hinweis betrachtet werden, daß auch die viralen DNA-Sequenzen der Exzisionsprodukte aus diesem Bereich der DNA stammen und somit die ursprüngliche Struktur besitzen. Als einen weiteren Hinweis könnte man die Tatsache betrachten, daß die Rat2 Zellen, die durch die klonierten Exzisionsprodukte der Zelllinien VLM und H65/90B transformiert wurden, lediglich nach Fusion mit COS-1 Zellen eine Aktivierung ihrer integrierten viralen Genome erkennen lassen (Abb. 25) und somit zeigen, daß ihre T-Antigene sich ebenso verhalten wie die, der ursprünglichen Zelllinien VLM und H65/90B (Abb. 5). Diese Hinweise schließen jedoch die Möglichkeit nicht aus,

daß die viralen Exzisionsprodukte dieser Zellen DNA-Sequenzen besitzen, die erst auf Grund von Rekombinationsereignissen während der Amplifikation oder Exzision eingeführt wurden, und die somit in der Struktur der integrierten viralen DNA nicht vorliegen.

Die DNA-Struktur der klonierten Exzisionsprodukte wurde durch Restriktionsenzyme und durch "Southern Blot" Hybridisierung analysiert (Abb. 10-12, 14, 15, 18). Es konnte gezeigt werden, daß sämtliche Klone jeweils eine frühe SV40 Region besitzen, deren Größe und Restriktionsmuster identisch zu denen, des SV40 wt erscheinen (Abb. 18). Damit wird deutlich, daß weder größere Duplikationen noch andere "Rearrangements" in der T-Antigen kodierenden Region vorliegen, wie sie sonst oftmals in viralen Genomen von transformierten Zelllinien beobachtet werden (Clayton and Rigby, 1981; May et al., 1981, 1983). Veränderungen in der DNA-Struktur liegen dagegen in der späten SV40 Region dieser Exzisionsprodukte vor (Abb. 18). Sämtlichen Klonen fehlen charakteristische Fragmente (HindIII E, F) aus der späten Region, was zumindest auf große Deletionen in diesem Bereich schließen läßt. Ähnliche Beobachtungen, daß Teile der späten Region des SV40 fehlen, wurden auch in Arbeiten von Gluzman and Ahrens (1982) gemacht, in denen ebenfalls Exzisionsprodukte aus transformierten Zellen kloniert und charakterisiert wurden. In den Kontrollbereichen der Klone pSV VLM 4, 8 und pSV H65 12, 17, 34 zeigen sich ferner im Vergleich zum SV40 wt (Stamm 776) Veränderungen der DNA-Struktur auf (Abb. 18). So besitzen zumindest die Klone pSV VLM 8 und pSV H65 12, 17 Duplikationen des SV40 "origin". Es fällt weiter auf, daß die "origin"-Bereiche sämtlicher Klone nur das HindIII/SphI-Fragment (5171-128) des SV40 zeigen, und daß das charakteristische 72 bp Fragment des Enhancer nach einer SphI Spaltung ausschließlich fehlt. DNA-Sequenzierungen der HindIII/SphI-Fragmente der Klone pSV VLM 4, 8 bzw. des SphI/EcoRI-Fragmente des Klons pSV VLM 4 konnten zeigen, daß

zwar das erste 72 bp "repeat" des Enhancer vorhanden ist, daß aber das zweite fehlt (Abb. 16, 17). Stattdessen finden sich virale DNA-Sequenzen, die normalerweise auf der späten Seite des zweiten 72 bp "repeat" vorliegen. Ebenso zeigen sich DNA-Sequenzen, die keine Homologien zur SV40 DNA aufweisen, und aus denen das nachweislich zelluläre EcoRI-Fragment (1.0 kb) subkloniert werden konnte (Abb. 16, 17). Aus diesen Sequenzierungen ging ebenfalls hervor, daß auch innerhalb des HindIII/SphI-Fragments dieser Klone Veränderungen in der DNA-Struktur im Vergleich zum SV40 wt (Stamm 776) vorliegen. Es handelt sich dabei um eine Basenpaar-Deletion (A) im Promotor-Bereich und um eine Transition (C → T) an der Stelle 5209. Da in der Sequenz des Klons pSV H65 34 diese Transition ebenfalls zu finden ist (Abb. 16), und da bekannt ist, daß die Zelllinien VLM, MKSA und H65/90B durch das SV40 Virus (Baylor-Stamm) transformiert wurden, ist es vorstellbar, daß bereits das Virus (DNA-Sequenz nicht bekannt) dieses Basenpaar an der Position 5209 besitzt. Ein Hinweis dafür könnte die Tatsache sein, daß der SV40 Virusstamm 777, durch den die Linien THK-1t, C0625 und C0631 transformiert wurden, an der Position 5209 keinen Cytosin- (C), sondern ebenfalls einen Thyminrest (T) besitzt. Ferner zeigt auch der SV40 Stamm wt 800, der von Mertz and Berg (1974) aus dem Stamm Rh911 etabliert wurde, an der Position 5209 einen Thyminrest (Hay and De Pamphilis, 1982). Ebenso ist bekannt, daß das ELO-Virus, durch das letztlich die Tumorzelllinie ELONA entstand, an der Position 5209 ein Thymin (T) zeigt (Matz, pers. Mitteilung) und daß diese Sequenz ebenso in den Exzisionsprodukten aus ELONA Zellen vorliegt.

Die klonierten Exzisionsprodukte der Zelllinien VLM und H65/90B exprimieren T-Antigene mit wt Größe, lassen aber auch die Expression von 100 kD Super T-Antigenen vermuten (Abb. 24). In Arbeiten von Levitt et al. (1985) konnte gezeigt werden, daß Super T-Antigene mit einer Größe von 100 kD von einer frühen Region des SV40 kodiert werden, die

zusätzlich auf ihrer späten Seite eine Duplikation des "origin", des ersten Exons und des Introns der T-Antigen kodierenden Sequenzen aufweist. Da zumindest die Klone pSV VLM 8 und pSV H65 12, 17 Duplikationen auf der späten Seite der T-Antigen kodierenden Sequenzen besitzen (Abb. 18), die zum einen "origin" DNA-Bereiche zeigen, und zum anderen aber auch DNA-Sequenzen aufweisen, die vermutlich aus dem Intron-Bereich der frühen Region (zusätzliche BstXI-Schnittstelle, Daten nicht gezeigt) stammen, könnten diese Klone unter Umständen nicht nur für wt T-Antigene, sondern auch für 100 kD Super T-Antigene kodieren.

Super T-Antigene mit einer Größe von 140-145 kD werden dagegen von einer frühen Region des SV40 kodiert, in der eine große Duplikation "in phase" vorliegt (Lovett et al., 1982). Sämtliche klonierten Exzisionsprodukte der Zelllinien VLM und H65/90B zeigen weder eine Expression von solchen Super T-Antigenen (Abb. 24), noch weisen die T-Antigen kodierenden Sequenzen in diesen Klonen große Duplikationen auf (Abb. 18). Da zumindest die ursprüngliche Zelllinie VLM neben wt T-Antigen (94 kD) auch die Expression von 100 kD- bzw. 140 kD Super T-Antigenen erkennen läßt (Huber et al., 1985), stellt sich die Frage, warum unter den klonierten Exzisionsprodukten dieser Zelllinie keine vorhanden sind, die DNA-Strukturen aufweisen, die für 140 kD Super T-Antigene kodieren könnten. Eine der möglichen Erklärungen dafür könnte sich aus der Tatsache ergeben, daß die Amplifizierung eines integrierten viralen Genoms die Aktivierung seines "origin" voraussetzt (s. 4.1). Da es durchaus vorstellbar ist, daß dieser virale "origin" für Replikation defekt ist, und daher nicht mehr durch ein wt T-Antigen aktiviert werden kann, hätte dies zur Folge, daß das virale Genom nicht amplifiziert und letztlich nicht freigesetzt werden könnte. Ein solch defekter "origin" könnte möglicherweise bei jenem viralen Genom vorliegen, das für das 140 kD Super T-Antigen kodiert. Somit wäre es nicht möglich diese DNA-Sequenzen zu

amplifizieren und sie als virale Exzisionsprodukte zu klonieren.

Die T-Antigene sämtlicher klonierten Exzisionsprodukte wurden auf ihre biologischen Funktionen hin getestet. Dabei zeigten alle diese T-Antigene die Fähigkeit, Rattenzellen zu transformieren (Abb. 21, Tab. 1), ließen aber auch erkennen, daß sie Defekte aufweisen in der Initiation der DNA-Replikation. Sämtliche klonierten Exzisionsprodukte waren nicht in der Lage in uninfizierten Affenzellen zu replizieren (Abb. 28), zeigten aber auch unter der Kontrolle des T-Antigens in COS-1 Zellen nur eine äußerst schwache DNA-Replikation (Abb. 28). Da die subklonierten "origin"-Bereiche der Klone pSV VLM 4, 8 in COS-1 Zellen eine wt ähnliche DNA-Replikation aufweisen (Abb. 29), spricht vieles dafür, daß zumindest die T-Antigene dieser Klone ein trans-dominantes Verhalten gegenüber wt T-Antigenen aufzeigen. Trans-dominante T-Antigene wurden unter anderem in Arbeiten von Stillman et al. (1985) und Farber et al. (1986) beschrieben. Dabei konnte letzterer durch spezifische Mutagenese replikationsdefekte T-Antigen Mutanten erzeugen, die zusätzlich ein trans-dominantes Verhalten gegenüber wt T-Antigenen aufweisen. Es wurde dabei jener Bereich des T-Antigens (As. 426-432) mutiert, der normalerweise die Aminosäuresequenz Gly(X₄)GlyLys aufweist, und der vielen Proteinen, die eine ATPase-Aktivität besitzen, gemein ist (Walker et al., 1982; Seif, 1982; Clertant and Seif, 1984). In Arbeiten von Lanford et al., (1980 A, B, 1984) konnte allerdings auch gezeigt werden, daß eine Mutation an der Position 128 (Lys) zu einer T-Antigen Mutante führt, die ebenfalls ein trans-dominantes Verhalten zeigt. Es erscheint somit äußerst wahrscheinlich, daß Mutationen an verschiedenen Stellen im Protein zu einem trans-dominanten Verhalten des T-Antigens führen können.

Aus Arbeiten von Farber et al. (1986) geht ferner nicht hervor, ob die Mutationen im Aminosäurebereich 426-432 des

T-Antigene nicht nur zu einem trans-dominanten Verhalten, sondern möglicherweise auch zu einem Defekt der ATPase-Aktivität führen. Die T-Antigene der klonierten Exzisionsprodukte aus den Zelllinien VLM und H65/90B, die in COS-1 Zellen ein trans-dominantes Verhalten erkennen lassen, und durch die Rattenzellen transformiert werden konnten, besitzen eine ATPase-Aktivität, die im Falle des T-Antigens der Zelllinie Rat SV H65 12 wt ähnlich erscheint, und für das T-Antigen der Linie Rat SV H65 34 sogar einen dreifach höheren Wert erkennen läßt als für das wt T-Antigen. Wenn man davon ausgeht, daß die T-Antigene dieser transformierten Rattenzelllinien tatsächlich die T-Antigene der klonierten Exzisionsprodukte aus den Linien VLM und H65/90B repräsentieren, dann könnten diese Daten möglicherweise einen ähnlichen Hinweis liefern, wie auch die Mutante von Lanford (1980 A, B, 1984), daß ein trans-dominantes Verhalten des T-Antigens nicht unbedingt mit einer defekten ATPase-Aktivität korreliert sein muß.

Es stellte sich ferner aber auch die Frage, warum sich die ATPase-Aktivitäten von den T-Antigenen der Linien Rat SV H65 12, 34 so erheblich von den Werten der T-Antigene (4x ATPase-Aktivität) aus der ursprünglichen Zelllinie H65/90B unterscheiden. Die Linie H65/90B besitzt in ihrer genomischen DNA mehr als eine frühe Region des SV40 (Abb. 9 D). Die Zellen dieser Linien exprimieren ferner auch unterschiedliche T-Antigen Spezies (Huber et al., 1985). In den Exzisionsprodukten dieser Zelllinie wurden die unterschiedlichen T-Antigen Spezies vermutlich von einander getrennt und konnten daher einzeln kloniert und charakterisiert werden. Die hierbei ermittelten Werte für die ATPase-Aktivität geben somit die biochemischen Eigenschaften der T-Antigene von den jeweiligen Exzisionsprodukten wieder. Diese Werte vernachlässigen allerdings gänzlich die Wechselwirkungen, die zwischen den verschiedenen T-Antigen Spezies innerhalb einer H65/90B Zelle stattfinden könnten. Es ist durchaus vorstellbar, daß

durch diese Wechselwirkungen nicht nur das Gleichgewicht zwischen einer möglichen Nukleotid-bindenden und einer DNA-bindenden Form der T-Antigene (Vogt et al., 1986) beeinflußt wird, sondern daß auch der Grad der Oligomerisierung dieser T-Antigene gesteuert wird. Da die einzelnen oligomeren Formen des T-Antigens unterschiedliche ATPase-Aktivitäten aufweisen (Bradley et al., 1982; Stahl et al., 1986), ist es durchaus denkbar, daß die T-Antigene in den Extrakten der H65/90B Zellen andere ATPase-Aktivitäten aufweisen, als wenn diese T-Antigene getrennt von einander vorliegen.

Aus den Werten für die ATPase-Aktivität heraus würde sich zumindest für die T-Antigene der Klone pSV VLM 4, 8 und pSV H65 17 vermuten lassen, daß ihre Defekte in der Initiation der DNA-Replikation (Abb. 28) möglicherweise durch diese eingeschränkten biochemischen Aktivitäten hervorgerufen werden. Ferner könnten die DNA-Bindungseigenschaften der T-Antigene von den Zelllinien Rat SV H65 17, 34 (Abb. 27) daraufhin deuten, daß auch diese eingeschränkten biochemischen Aktivitäten möglicherweise dazu beitragen, daß diese T-Antigene replikationsdefekt sind (Abb. 28).

Es zeigte sich aber, daß die T-Antigene der Klone pSV VLM 4, 8 und pSV H65 34 nicht generell defekt für DNA-Replikation sind, sondern daß sie lediglich ihre eigenen "origin"-Bereiche nicht mehr aktivieren können. Diese "origin"-Bereiche zeigen im Vergleich zum wt "origin" (Virusstamm 776) an der Position 5209 einen Basenaustausch, der sich als C T Transition darstellt (Abb. 16).

Darüberhinaus besitzen die "origin"-Bereiche der Klone pSV VLM 4, 8 jeweils eine Basenpaar-Deletion (81) im Promotor-Bereich (Abb. 16), die allerdings keinen Einfluß auf die Replikationseffizienz ausübt (Abb. 35). Vielmehr wird deutlich, daß das Basenpaar an der Position 5209 wohl den entscheidenden Faktor darstellt. Da nach Kotransfektion mit dem klonierten HindIII/SphI-Fragment des SV40 wt (Stamm 776) die Klone pSV VLM 4, 8 und pSV H65 34 jeweils in der

Lage sind zu replizieren, spricht vieles dafür, daß Rekombinationsereignisse stattfinden, die in den "origin"-Bereichen der Klone zu DNA-Strukturen führen, die dann durch die mutierten T-Antigene dieser Klone aktiviert werden können. Diese DNA-Strukturen könnten möglicherweise an der Position 5209 einen Cytosinrest (C) besitzen. In Arbeiten von Subramanian (1983) konnte gezeigt werden, daß zwischen transfizierten SV40 DNA-Molekülen homologe- wie auch nicht-homologe Rekombinationen stattfinden, wobei es deutlich wurde, daß weder die DNA-Replikation noch das T-Antigen dieser SV40 DNA-Moleküle für die Rekombinationsereignisse erforderlich waren.

In Arbeiten von Deb et al. (1986), in denen durch Substitution der einzelnen Basen, die funktionellen Domänen des "minimal origin" genau kartiert wurden, konnte gezeigt werden, daß ein Basenaustausch an der Position 5209 keinen Einfluß auf die Replikationseffizienz des "origin" in COS-1 Zellen ausübt. Ferner zeigten auch DNase-Schutz- bzw. Alkylierungsexperimente, daß das Basenpaar an der Position 5209 keine Bedeutung für die DNA-Bindung des wt T-Antigens besitzt (De Lucia et al., 1983; Jones and Tjian, 1984). Dagegen führten Substitutionen im benachbarten Bereich 5210-5220 zu einer drastischen Abnahme der Replikation des "minimal origin" (Deb et al., 1986). Dieser 10 bp große Bereich besitzt eine Sequenz, die hochkonserviert ist unter den Primaten-Papovaviren, und die auf Grund ihrer Struktur Interaktionen mit viralen wie auch zellulären Proteinen vermuten läßt. Zum einen konnte gezeigt werden, daß auf der einzelsträngigen DNA des "minimal origin" im Bereich von 5210-5220 Initiationsstellen der Primase liegen (Hay and De Pamphilis, 1982; Yamaguchi et al., 1985), und zum anderen finden sich in diesem DNA-Bereich Sequenzen, die ebenfalls in den beiden 72 bp "repeats" des Enhancer vorliegen, und die vermutlich Bindungsstellen für ein Transkriptions-Aktivator-Protein darstellen (Tjian, pers. Mitteilung; Traut and Fanning, pers. Mitteilung). Da es nicht auszuschließen

ist, daß dieses Protein auch eine große Bedeutung für die DNA-Replikation besitzt, könnte dies ein Beispiel für einen zellulären Faktor sein, den das SV40 Virus für seine Replikation benötigt und der in diesem DNA-Bereich bindet.

Diese Daten sprechen bisher nicht dafür, daß auch das Basenpaar an der Position 5209 an den Wechselwirkungen mit zellulären Faktoren beteiligt ist. Da sich aber bei den Klonen pSV VLM 4, 8 und pSV H65 34 eine Mutation abzeichnet, die zwar eine DNA-Bindung dieser T-Antigene an die eigenen "origin"-Bereiche (Abb. 36; Bindung an Bindungsstelle II muß noch überprüft werden) vermutlich nicht beeinträchtigt, die aber dennoch die Aktivierung dieser "origin"-Bereiche blockiert, könnte eine der möglichen Interpretationen dafür doch jene sein, daß hier Wechselwirkungen zwischen T-Antigen und zellulären Faktoren im Bereich des Basenpaar 5209 gestört sind.

"Marker Rescue"-Experimente mit den T-Antigen kodierenden Regionen dieser Klone bzw. Reinigung und Charakterisierung der mutierten T-Antigene sollten dazu führen, die Mutationen zu lokalisieren und möglicherweise neue Wechselwirkungen zwischen T-Antigenen und zellulären Faktoren zu erkennen.

Tab. 3: Zusammenfassung der biochemischen und biologischen Eigenschaften der Klone pSV VLM 4, 8 und pSV H65 12, 17, 34

	pSV VLM 4	pSV VLM 8	pSV H65 12	pSV H65 17	pSV H65 34
"origin"- Duplikation	-	+	+	+	-
zell. Sequenzen im "origin"-Bereich	+	+	(+)	(+)	(+)
Super T-Antigen	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Replikation in COS-1 Zellen	+/-	+/-	+/-	+/-	+
Replikation in TC7 Zellen	-	-	-	-	-
Replikation von pEP DNA in TC7 Zellen	+	+	-	+	+
"origin"-Bindung					
Bindungsstelle I	+	+	+	+	+
Bindungsstelle II	+	+	+	(-)	(-)
ATPase-Aktivität im Vergleich zum wt T-Antigen	16%	23%	97%	21%	337%
Rat2 Zellen trans- formiert durch diese Klone,					
Replikation nach Fusion mit COS-1 Zellen	+	+	+	+	+
TC7 Zellen	-	-	-	-	-

6. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß sechs von sieben untersuchten SV40 transformierten Zelllinien T-Antigene exprimieren, die Defekte zeigen in der Initiation der DNA-Replikation. Darunter befanden sich auch die beiden Zelllinien VLM und H65/90B, die auf Grund der biochemischen Aktivitäten ihrer mutierten T-Antigene als besonders interessant zu betrachten waren. Die integrierten viralen Genome dieser beiden Linien wurden daher kloniert und ihre DNA-Struktur durch Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung genauer charakterisiert. Es zeigte sich, daß diese viralen Genome jeweils eine frühe Region des SV40 besitzen, die sich in ihrem Restriktionsmuster nicht von dem unterscheidet, das der SV40 wt aufweist. Dagegen liegen Veränderungen in der DNA-Struktur sowohl in viralen Kontrollbereich wie auch in der späten Region des SV40 vor. Hierbei finden sich Duplikationen der "origin"-Bereiche, zelluläre DNA-Insertionen sowie Deletionen des zweiten 72 bp "repeat" des Enhancer. Darüberhinaus wird deutlich, daß "origin"-Bereiche aus den viralen Genomen beider Zelllinien an der Position 5209 eine C T Transition im Vergleich zum SV40 wt (Stamm 776) besitzen.

Die T-Antigene, die von diesen viralen Genomen exprimiert werden, wurden auf ihre biochemischen Aktivitäten sowie ihre biologischen Funktionen hin untersucht. Dabei wurde neben ihrem DNA-Bindungsverhalten und ihrer ATPase-Aktivität auch ihre Fähigkeit zur Zelltransformation bzw. DNA-Replikation getestet. Es zeigten sich T-Antigene mit einem eingeschränkten DNA-Bindungsverhalten und auch solche, die eine verminderte ATPase-Aktivität aufweisen. Andererseits fanden sich aber auch T-Antigene mit einem normalen DNA-Bindungsverhalten und solche, die eine normale- bzw. extrem hohe ATPase-Aktivität besitzen.

Sämtliche T-Antigene dieser viralen Genome können Rattenzellen transformieren, zeigen aber Defekte in der Initiation der DNA-Replikation. Ferner besitzen diese T-Antigene ein trans-dominantes Verhalten gegenüber wt T-Antigenen. Bei einigen dieser T-Antigene wurde deutlich, daß sie nicht generell defekt für DNA-Replikation sind, sondern daß sie lediglich die "origin"-Bereiche ihrer "eigenen" Genome nicht mehr aktivieren können. Es zeigte sich hierbei ein möglicher Zusammenhang zwischen diesem Defekt und der Transition an der Position 5209.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Antman, K. H., and Livingston, D. M. (1980). Intracellular neutralisation of SV40 tumor antigens following microinjection of specific antibody.
Cell 19, 627-635.
- Baumann, E. A., and Hand, R. (1982). Phosphorylation and dephosphorylation alter the structure of D2 hybrid T-antigen.
J. Virol. 44, 78-87.
- Bergsma, D. J., Olive, D. J., Hartzell, S. W., and Subramanian, K. N. (1982). Territorial limits and functional anatomy of the simian virus 40 replication origin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 381-385.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523.
- Black, P. H., and Rowe, W. P. (1963). An analysis of SV40 induced transformation of hamster kidney tissue in vitro I: General characteristics.
Proc. Natl. Sci. USA 50, 606-613.
- Botchan, M., Topp, W., and Sambrook, J. (1979). Studies on simian virus 40 excision from cellular chromosomes.
C. S. H. Sym. Quant. Biol. 43, 709-719.
- Bradley, M. K., Griffin, J. D., and Livingston, D. M. (1982). Relationship of oligomerization to enzymatic and DNA-binding properties of the SV40 large T-antigen.
Cell 28, 125-134.

- Brandner, G., Burger, A., Neumann-Haefelin, D., Reinke, C., and Helwig, W. (1977). Isolation of simian virus 40 from a newborn child.
J. Clin. Microbiol. 5, 250-252.
- Bullock, P., Forrester, W., and Botchan, M. (1984).
DNA sequence studies of simian virus 40 chromosomal excision and integration in rat cells.
J. Mol. Biol. 174, 55-84.
- Chen, E. J., and Seeburg, P. H. (1985). Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA.
DNA 4, 166-170.
- Clark, R., Lane, D. P., and Tjian, R. (1981). Use of monoclonal antibodies as probes of simian virus 40 T-antigen ATPase activity.
J. Biol. Chem. 256, 11854-11858.
- Clark, R., Peden, K., Pipas, J., Nathans, D., Tjian, R. (1983). Biochemical activities of T-antigen proteins encoded by simian virus 40 A gene deletion mutants.
Mol. Cell Biol. 3, 220-228.
- Clayton, C. E., and Rigby, P. W. J. (1981). Cloning and characterization of the integrated viral DNA from three lines of SV40-transformed mouse cells.
Cell 25, 547-559.
- Clayton, C. E., Lovett, M., and Rigby, R. W. J. (1982). Functional analysis of a simian virus 40 super-T-antigen.
J. Virol. 44, 974-982.
- Clerant, P., and Seif, I. (1984). A common function für polyoma virus large-T and papilloma virus E1 proteins?
Nature (London) 311, 276-279.

- Cole, C. N., Tornow, J., Clark, R., and Tjian, R. (1986).
Properties of the simian virus 40 (SV40) large
T-antigens encoded by SV40 mutants with deletions
in gene A.
J. Virol. 57, 539-546.
- Conrad, S. E., Liu, C.-P., and Botchan, M. R. (1982).
Fragment spanning the SV40 replication origin is
the only DNA sequence required in cis for viral
excision.
Science (Washington, D. C.) 218, 1223-1225.
- Cosman, D. J., and Tevethia, M. J. (1981). Characterization
of a temperature-sensitive, DNA-positive, nontrans-
forming mutant of simian virus 40.
Virology 112, 605-624.
- Covey, L., Chio, Y., and Prives, C. (1984). Association of
simian virus 40 T-antigen with the nuclear matrix
in infected and transformed monkey cells.
Mol. Cell Biol. 4, 1384-1392.
- Crowe, R., Ozer, H., and Rifkin, D. (1983). Experiments with
normal and transformed cells. A laboratory manual
for working with cells in culture.
Cold Spring Harbour Laboratory, New York
- Deb, S., De Lucia, A. L., Baur, C.-P., Koff, A., and
Tegtmeier, P. (1986). Domain structure of the simian
virus 40 core origin of replication.
Mol. Cell Biol. 6, 1663-1670.
- Defendi, V., and Jensen, F. (1967). Oncogenicity by DNA
tumor viruses: enhancement after ultraviolet and
cobalt 60 radiations.
Science 157, 703-705.

- De Lucia, A. L., Lewton, B. A., Tjian, R., and Tegtmeyer, P. (1983). Topography of simian virus 40 A protein-DNA complexes: Arrangement of pentanucleotide interaction sites at the origin of replication. *J. Virol.* 46, 143-150.
- De Lucia, A. L., Deb, S., Partin, K., and Tegtmeyer, P. (1986). Functional interactions of the simian virus 40 core origin of replication with flanking regulatory sequences. *J. Virol.* 57, 138-144.
- Deppert, W., Hanks, K., and Henning, R. (1980). Simian virus 40 T-antigen-related cell surface antigen: serological demonstration on simian virus 40-transformed monolayer cells in situ. *J. Virol.* 35, 505-518.
- Di Maio, D., and Nathans, D. (1980). Cold sensitive regulatory mutants of simian virus 40. *J. Mol. Biol.* 140, 129-142.
- Di Maio, D., and Nathans, D. (1982). Regulatory mutants of simian virus 40. Effect of mutations at a T-antigen binding site on DNA replication and expression of viral genes. *J. Mol. Biol.* 156, 531-548.
- Dretzen, G., Bellard, M., Sassone-Corsi, P., and Chambon, P. (1981). A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 112, 295-298.
- Dubbs, D. R., Kit, S., De Torres, R. A., Anken, M. (1967). Virogenic properties of bromodeoxyuridine-sensitive and bromodeoxyuridine-resistant simian virus 40-transformed mouse kidney cells. *J. Virol.* 1, 968-979.

- Fanning, E., Nowak, B., and Burger, C. (1981). Detection and characterization of multiple forms of simian virus 40 large T-antigen.
J. Virol. 37, 92-102.
- Fanning, E., Westphal, K.-H., Brauer, D., and Cörlin, D. (1982). Subclasses of simian virus 40 large T-antigen: Differential binding of two subclasses of T-antigen from productively infected cells to viral and cellular DNA.
The EMBO J. 1, 1023-1028.
- Fanning, E., Burger, C., Huber, B., Markau, U., Sperka, S., Thompson, S., Vekalopoulou, E., Vogt, B. (1984). How does SV40 T-antigen control initiation of viral DNA replication?
Advances in Experimental Medicine and Biology, 179, 241-249.
- Farber, J. M., Peden, K. W. C., and Nathans, D. (1986). Trans-dominant defective mutants of SV40 T-antigen.
J. Virol. 507, 000-000.
- Fiers, W., Contreras, R., Haegeman, G., Rogiers, R., van de Voorde, A., van Heuverswyn, H., van Herreweghe, J., Volckaert, G., and Yaebaert, M. (1978). Complete nucleotide sequence of SV40 DNA.
Nature 273, 113-120.
- Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants.
Cell 23, 175-182.
- Gluzman, Y., and Ahrens, B. (1982). SV40 early mutants that are defective for viral DNA synthesis but competent for transformation of cultured rat and simian cells.
Virology 123, 78-92.

- Graham, F. L., and van der Eb, A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA.
Virology 52, 455-456.
- Grunstein, M., and Hogness, D. S. (1975). Colony hybridisation: a method for the isolation of cloned DNA's that contain a specific gene.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961-3965.
- Gurney, E. G., Tamowski S., and Deppert, W. (1986). Antigenic binding sites of monoclonal antibodies specific for simian virus 40 large T-antigen.
J. Virol. 57, 1168-1172.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.
J. Mol. Biol. 166, 557-580.
- Hansen, U., Tenen, D. G., Livingston, D. M., and Sharp, P. A. (1981). T-antigen repression of SV40 early transcription from two promoters.
Cell 27, 603-612.
- Hassell, J. A., Lukanidin, E., Fey, G., and Sambrook, J. (1978). The structure and expression of two defective adenovirus 2-simian virus 40 hybrids.
J. Mol. Biol. 120, 209-224.
- Hay, R. T., and De Pamphilis, M. L. (1982). Initiation of SV40 DNA replication in vivo: location and structure of 5'ends of DNA synthesized in the ori region.
Cell 29, 767-779.
- Hinzpeter, M., Fanning, E., and Deppert, W. (1986). A new sensitive target-bound DNA binding assay for SV40 large T-antigen.
Virology 148, 159-167.

- Hirt, B. (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures.
J. Mol. Biol. 26, 365-369.
- Huber, B. (1983). Diplomarbeit, Universität München
- Huber, B., Vakalopoulou, E., Burger, C. and Fanning, E. (1985). Identification and biochemical analysis of DNA replication-defective large T-antigens from SV40-transformed cells.
Virology 146, 188-202.
- Jay, G., Nomura, S., Anderson, C. W., and Khoury, G. (1981). Identification of the SV40 agnogene product: A DNA binding protein.
Nature 291, 346-349.
- Jones, K. A., and Tjian, R. (1984). Essential contact residues within SV40 large T-antigen binding sites I and II identified by alkylation interference.
Cell 36, 155-162.
- Kahn, M., Kolter, R., Thomas, C., Figurski, D., Meyer, R., Remaut, E., and Helinski, D. R. (1979). Plasmid cloning vehicles derived from plasmids Col E1, F, R6K and RK2.
Methods Enzymol. 68, 268-280.
- Kessler, S. W. (1975). Rapid isolation of antigens from cells with a Staphylococcal protein A-antibody absorbent: Parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A.
J. Immunol. 115, 1617-1624.

- Kit, S., Surimura, T., and Dubbs, D. R. (1969).
Transplantable mouse tumor induced by injection
of SV40-transformed mouse kidney cells.
Int. J. Cancer 4, 384-392.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during
the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685.
- Lanford, R. E., and Butel, J. S. (1984) A. Inhibition of
nuclear migration of wild-type SV40 tumor antigen
by a transport-defective mutant of SV40-adenovirus 7
hybrid virus.
Virology 105, 303-313.
- Lanford, R. E., and Butel, J. S. (1984) B. Biochemical
characterization of nuclear and cytoplasmic forms of
SV40 tumor antigens encoded by parental and
transport-defective mutant of SV40-adenovirus 7
hybrid viruses.
Virology 105, 324-327.
- Lanford, R. E., and Butel, J. S. (1984). Construction and
characterization of an SV40 mutant defective in
nuclear transport of T-antigen.
Cell 37, 801-813.
- Levi, S. (1981). Carcinogen-mediated amplification of viral
DNA sequences in simian virus 40-transformed Chinese
hamster embryo cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6144-6148.
- Levinson, A., Silver, D., and Seed, B. (1984). Minimal size
plasmids containing an M13 origin for production of
single-strand transducing particles.
J. Mol. Ap. Gen. 2, 507-517.

- Levitt, A., Chen, S., Blanck, G., George, D., and Pollack, P. (1985). Two integrated partial repeats of simian virus 40 together code for a super T-antigen. *Mol. Cell Biol.* 5, 742-750.
- Li, J. J., and Kelly, T. (1985). Simian virus 40 DNA replication in vitro: aspecificity of initiation and evidence for bidirectional replication. *Mol. Cell Biol.* 5, 1238-1246.
- Li, J. J., Peden, K. W. C., Dixon, R. A. F., and Kelly, T. (1986). Functional organization of the simian virus 40 origin of DNA replication. *Mol. Cell Bio.* 6, 1117-1128.
- Lovett, M., Clayton, C. E., Murphy, D., Rigby, P. W. J., Smith, A. E., and Chandry, F. (1982). Structure and synthesis of a simian virus 40 super-T antigen. *J. Virol.* 44, 963-973.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbour, New York
- Manos, M. M., and Gluzman, Y. (1984). Simian virus 40 large T-antigen point mutants that are defective in viral DNA replication but competent in oncogenic transformation. *Mol. Cell Biol.* 4, 1125-1133.
- Manos, M. M., and Gluzman, Y. (1985). Genetic and biochemical analysis of transformation-competent, replication-defective simian virus 40 large T-antigen mutants. *J. Virol.* 53, 120-127.

- Margolske, R. F., and Nathans, D. (1984). Simian virus 40 mutant T-antigens with relaxed specificity for the nucleotide sequence at the viral DNA origin of replication. *J. Virol.* 49, 386-393.
- Martin, R. G., and Oppenheim, A. (1977). Initiation points for DNA replication in nontransformed and simian virus 40-transformed chinese hamster lung cells. *Cell* 11, 859-869.
- Mastrangelo, I. A., Hough, P. V. C., Wilson, V. G., Wall, J. S., Hainfeld, J. F., Tegtmeyer, P. (1985). Monomers through trimers of large T-antigen in region I and monomers through tetramers in region II bind to SV40 origin DNA as stable structures in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 3626-3630.
- Matz, B., Schlehofer, J. R., zur Hausen, H., Huber, B., and Fanning, E. (1985). Herpes simplex virus- and chemical carcinogen-induced amplification of SV40 DNA sequences in transformed cells is cell line-dependent. *Int. J. Cancer* 35, 521-525.
- May, E., Jeltech, M., and Gannon, F. (1981). Characterization of a gene encoding a 115 K super-T antigen expressed by a SV40-transformed cell line. *Nucleic Acids Res.* 9, 4111-4128.
- May, E., Leane, C., Prives, C., Borde, J., and May, P. (1983). Study of the functional activities concomitantly retained by the 115000 Mr Super T-antigen, an evolutionary variant of simian virus 40 large T-antigen expressed in transformed rat cells. *J. Virol.* 45, 901-913.

- Mc Cutchan, J. H., and Pagano, J. S. (1968). Enhancement of the infectivity of simian virus 40 deoxyribonucleic acid with diethyl-aminoethyl-dextran. *J. Natl. Cancer Inst.* 41, 351-357.
- Mertz, J. E., and Berg, P. (1974). Defective SV40 genomes: isolation and growth of individual clones. *Virology* 62, 112-124.
- Miller, J., Bullock, P., and Botchan, M. (1984). Simian virus 40 T-antigen is required for viral excision from chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 7534-7538.
- Murakami, Y., Wobbe, C. R., Weissbach, L., Dean, F. B., and Hurwitz, J. (1986). Role of DNA polymerase α and DNA primase in simian virus 40 DNA replication in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2869-2873.
- Myers, R. M., and Tjian, R. (1980). Construction and analysis of simian virus 40 origins defective in tumor antigen binding and DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 6491-6495.
- Myers, R. M., Rio, D. C., Robbins, A. K., and Tjian, R. (1981). SV40 gene expression is modulated by the cooperative binding of T-antigen to DNA. *Cell* 25, 373-384.
- Oren, M., Winocour, E., and Prives, C. (1980). Differential affinities of simian virus 40 large tumor antigen for DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 220-224.
- Osborn, M., and Weber, K. (1975). T-antigen, the A function and transformation. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 39, 267-276.

- Paucha, E., Kalderon, D., Harvey, R. W., and Smith, A. E. (1986). Simian virus 40 origin DNA-binding domain on large T-antigen. *J. Virol.* 57, 60-64.
- Pellegrini, S., Dailey, L., and Basilico, C. (1984). Amplification and excision of integrated polyoma DNA sequences require a functional origin of replication. *Cell* 36, 943-949.
- Pellicer, A., Robins, D., Wold, D., Sweet, B., Jackson, I., Lowry, I., Robert, J. M., Sim, G. K., Siverstein, S., and Axel, R. (1980). Altering genotype and phenotype by DNA mediated gene transfer. *Science* 209, 1414-1422.
- Pintel, D., Bouck, N., and Di Mayorca, G. (1981). Separation of lytic and transforming of the simian virus 40 A region: Two mutants which are temperature sensitive for lytic functions have opposite effects on transforming. *J. Virol.* 38, 518-528.
- Prives, C., Barnet, B., Scheller, A., Khoury, G., and Jay, G., (1982). Discrete region of simian virus 40 large T-antigen are required for nonspecific and viral origin-specific DNA binding. *J. Virol.* 43, 73-82.
- Reddy, V. B., Thimmappaya, B., Dhar, R., Subramanian, K. N., Zain, B. S., Pan, J., Glosh, P. K., Celma, M. L., and Weissmann, S. M. (1978). The genome of simian virus 40. *Science* 200, 494.

- Reed, S. J., Ferguson, J., Davis, R. W., and Stark, G. R. (1975). T-antigen binds to simian virus 40 DNA at the origin of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 1605-1609.
- Rigby, P. J. W., Dieckman, M., Rhodes, C., and Berg, P. (1977). Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick-translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 98, 503-515.
- Rigby, P., and Lane, D. (1983). The structure and function of SV40 large T-antigen. *Adv. Viral Oncology* 3, 31-57.
- Rio, D., Robbins, A., Myers, R., Tjian, R. (1980). Regulation of simian virus 40 early transcription in vitro by a purified tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5706-5710.
- Robb, J. A., and Huebner, K. (1973). Effect of cell chromosome number on simian virus 40 replication. *Exp. Cell Res.* 81, 120-126.
- Ryder, K., Vakalopoulou, E., Mertz, R., Mastrangelo, I., Hough, P., Tegtmeyer, P., and Fanning, E. (1985). Seventeen base pairs of region I encode a novel tripartite binding signal for SV40 T-antigen. *Cell* 42, 539-548.
- Schnierle, B. (1986). Diplomarbeit, Universität München
- Seif, R. (1982). New properties of simian virus 40 large T-antigen. *Mol. Cell Biol.* 2, 1463-1471.

- Shalloway, D., Kleinberger, T., and Livingston, D. M. (1980). Mapping of SV40 DNA replication origin region binding sites for the SV40 T-antigen by protection against exonuclease III digestion. *Cell* 20, 411-422.
- Shortle, D. R., Margolske, R. F., and Nathans, D. (1979). Mutational analysis of the simian virus 40 replicon: pseudorevertants of mutants with a defective replication origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 6128-6131.
- Simmons, D. (1986). DNA-binding region of the simian virus 40 T-antigen. *J. Virol.* 57, 776-785.
- Small, M. B., Gluzman, Y., and Ozer, H. L. (1982). Enhanced transformation of human fibroblasts by origin-defective simian virus 40. *Nature (London)* 296, 671-672.
- Soule, H. R., and Butel, J. S. (1979). Subcellular localization of simian virus 40 large tumor antigen. *J. Virol.* 30, 523-532.
- Southern, E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-516.
- Stahl, H., Dröge, P., Knippers, R. (1986). DNA helicase activity of SV40 large tumor antigen. *EMBO Journal* 5, 1939-1944.
- Staufenbiel, M., and Deppert, W. (1983). Different structural systems of the nucleus are targets for SV40 large T-antigen. *Cell* 33, 173-181.

- Stillman, B., Gerard, R. D., Guggenheimer, R. A., Gluzman, Y. (1985). T-antigen and template requirements for SV40 DNA replication in vitro. *The EMBO J.* 4, 2933-2939.
- Stringer, J. R. (1982). Mutant of simian virus 40 large T-antigen that is defective for viral DNA synthesis, but competent for transformation of cultured rat cells. *J. Virol.* 42, 854-864.
- Subramanian, K. N., and Shenk, T. (1978). Definition of the boundaries of the origin of DNA replication in simian virus 40. *Nucleic Acid Res.* 5, 3635-3642.
- Subramanian, K. N., and Berg, P. (1983). Homologous and nonhomologous recombination in monkey cells. *Mol. Cell Biol.* 3, 1040-1052.
- Sutcliffe, J. G. (1978). Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43, 43-77.
- Sutter, D., Westphal, M., and Doerfler, W. (1978). Patterns of integration of viral DNA sequences in the genomes of adenovirus type 12 transformed hamster cells. *Cell* 14, 569-585.
- Tegtmeier, P. (1975). Function of simian virus 40 gene A in transforming infection. *J. Virol.* 15, 613-618.
- Tegtmeier, P., and Andersen, B. (1981). Partial purification of SV40 A protein and a related cellular protein from permissive cells. *Virology* 115, 67-74.

- Tegtmeier, P., Andersen, B., Shaw, S. B., and Wilson, V. G. (1981). Alternative interactions of the SV40 A protein with DNA. *Virology* 115, 75-87.
- Tegtmeier, P., Lewton, B. A., De Lucia, A. L., Wilson, V. G., Ryder, K. (1983). Topography of simian virus 40 A protein-DNA complexes: arrangement of protein bound to the origin of replication. *J. Virol.* 46, 151-161.
- Tegtmeier, P., Andersen, M. E., Lewton, B. A., De Lucia, A. L., Wright, P. J., and Cohen, G. L. (1984). Critical spatial requirement within the origin of simian virus 40 DNA replication. *J. Virol.* 51, 91-96.
- Tjian, R. (1978). Protein-DNA interactions at the origin of simian virus 40 DNA replication. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43, 655-662.
- Tjian, R. (1978). The binding site on SV40 DNA for a T-antigen-related protein. *Cell* 13, 165-179.
- Toozé, J. (1981). *Molecular Biology of Tumor Virus: Part 2, DNA Tumor Viruses*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Topp, W. C., Rifkin, D. B., and Sleigh, M. J. (1981). SV40 mutants with an altered small-t protein are tumorigenic in newborn hamsters. *Virology* 111, 341-350.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.

- Twigg, A., and Sherratt, D. (1980). Trans-complementable copy number mutants of plasmid ColE1. *Nature* 283, 216-218.
- Vieira, J., and Messing, J. (1982). The pUC-plasmids, a M 13 mp 7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19, 259-268.
- Vinograd, J., Harris, J., Davidson, N., and Dave, W. F. (1963). The buoyant behaviour of viral and bacterial DNA in alkaline CsCl. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 49, 12-17.
- Vogt, B., Vakalopoulou, E., and Fanning, E. (1986). Allosteric control of simian virus 40 T-antigen binding to viral origin DNA. *J. Virol.* 58, 765-772.
- Wahl, G. M., Stern, M., and Stark, G. R. (1979). Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzylloxymethyl paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 3683-3687.
- Walker, J. E., Saraster, M., Runswick, M. J., and Gay, N. J. (1982). Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO J.* 1, 945-951.
- Wallace, R. B., Johnson, M. J., Suggs, S. Y., Miyoski, K., Bhatt, R., Itakura, K. (1981). A set of synthetic primers for DNA sequencing in the plasmid pBR322. *Gene* 16, 21-26.

- Yanaguchi, M., Hendrickson, E. A., and De Pamphilis, M. L. (1985). DNA primase-DNA polymerase from simian cells: sequence specificity of initiation sites on simian virus 40 DNA. *Mol. Cell Biol.* 5, 1170-1183.
- Zarling, J. M., and Tevethia, S. S. (1973). Transplantation immunity of simian virus 40-transformed cells in tumor-bearing mice. I. Development of cellular immunity to simian virus 40 tumor-specific transplantation antigens during tumorigenesis by transplanted cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 50, 137-145.

8. Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildungen
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
Ci	Curie (1 Ci = 3.7×10^{10} Becquerel)
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute
d	Tage
g/l	Gramm pro Liter
h	Stunde
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
u	Units
ug	Mikrogramm
ul	Mikroliter
V	Volt
wt	Wildtyp

Lebenslauf

Name	Bernard Maria H u b e r
Geburtsdatum	06.08.1957
Geburtsort	München
Familienstand	verheiratet seit 1982, ein Kind
1964-1968	Volksschule Grafing
1968-1977	Gymnasium Grafing
1977	Allgemeine Hochschulreife
WS 1977/78	Universität Augsburg Studiengang Wirtschaftswissenschaften
SS 1978-SS 1979	Universität Würzburg Studiengang Diplom-Biologie
ab SS 1979	Universität München Studiengang Diplom-Biologie
März 1982	Mündliche Diplomprüfung
März 1982-	Diplomarbeit unter Anleitung von Frau Prof.
März 1983	Dr. E. Fanning-Honegger am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians- Universität, München Thema: Untersuchung der DNA-Replikations- fähigkeit von Tumor-Antigenen aus SV40 transformierten Zellen
März 1983-	Promotionsarbeit am Institut für Biochemie
September 1986	der Universität München, unter Anleitung von Frau Prof. Dr. E. Fanning-Honegger Thema: Identifizierung, Klonierung und Charakterisierung von replikations- defekten SV40 Genomen aus SV40 transformierten Nagetierzellen

